

N° D'ORDRE :

.....

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE MONTPELLIER

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Simonne ROUS

1^{re} THÈSE. — LA RÉGULATION QUALITATIVE DES ACIDES GRAS
CHEZ LES SOURIS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 26 Septembre 1962 devant la Commission d'examen.

MM. E. KAHANE
I. ASSENMACHER
H. GOLSON-GUASTALLA
P. FAVARGER
(Université de Genève)

Président.

Examineurs.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

NO D'ORDRE :

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

SIMONNE ROUS



1^{re} THÈSE. — LA RÉGULATION QUALITATIVE DES ACIDES GRAS CHEZ LES
SOURIS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1962 devant la Commission d'examen.

MM. E. KAHANE.....

I. ASSENMACHER.....

H. GOLSON-GUASTALLA.....

P. FAVARGER.....

(Université de Genève)

Président.

Examineurs.

Errata

- p. 9: ligne 7, lire et non d'acides non saturés au lieu de et non d'acides libres.
- p. 16: ligne 5, lire 5 heures à la place de 5%.
- p. 19: ligne 6, ajouter électrique après conductibilité.
- p. 20: ligne 12, lire pentaérythritol et non pentaérythrytol.
- p. 21: ligne 11, après dosage, continuer la phrase par, par transmission, après amplification électronique, de la différence de potentiel obtenue, à un potentiomètre enregistreur.
- figure 11: échelle, 1,79 cm est réduit sur la courbe à 1 cm.
- p. 26: ligne 8, lire, b) Description de l'appareil de comptage.
- p. 35: ligne 9, lire le palmitoléique provenant du palmitique, l'oléique du stéarique.
- p. 36: ligne 9, lire, Synthèse in vivo et non système in vivo.
- p. 50: ligne 7, la composition du mélange tampon est donnée en parties.
- p. 51: ligne 10, remplacer ou par en, avant l'absence d'inhibiteur.
- p. 61: ligne 13, n'ont rien à voir au lieu de n'ont rien à voir.
- p. 65: ligne 2, il s'agit de 40 γ et non de 40 g de ciment.
- Tableaux 7 et 8 : position intervertie, le 7 se trouve en page 65 au lieu de 70, inversement le 8 en page 70 au lieu de 65.
- p. 68: ligne 1, lire, Conversions des acides saturés en non saturés.
ligne 9, lire, Conversions des acides non saturés en acides saturés.
- p. 75: ligne 22, remplacer in vivo par in vitro.

FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

Doyen	B. CHARLES, Mathématiques pures.
Assesseurs.....	R. JOUTY, Physique. I. ASSENMACHER, Physiologie animale.
Doyen honoraire	P. MATHIAS, Zoologie et Biologie générale. MM.
Professeurs honoraires	R. JACQUES, M. CASTERAS, E. CARRIERE E. TURRIERE, J. SOULA, G. DENIZOT. MM.
Professeurs titulaires	M. MOUSSERON Chimie. L. EMBERGER Botanique. C. BOUHET Physique. P. MATHIAS Zoologie et Biologie générale. P. CHATELAIN Minéralogie et Cristallo- graphie. O. TUZET (Mlle) Zoologie et Biologie générale. G. GAUQUIL (Mlle)..... Chimie. J. GRANIER Physique. J. SALVINIEN Chimie-physique. G. COUCHET Mécanique supérieure A.M. VERGNOUX (Mlle)... Physique. P. SILBER Chimie minérale. J. AVIAS Géologie. P. VIELES Chimie. J. RABINOVITCH Physique. E. KAHANE Chimie biologique. J.J. MOREAU Mécanique rationnelle. C. CHALIN Physique. J. MOTTE Botanique. MM.
Professeurs sans chaire	J. CHARLES (Mme) Mathématiques. R. JACQUIER Chimie. DE POUQUES (Mlle) Botanique. R. LAFONT Physique. P. MURAOUR Géophysique appliquée.

MM.

Maîtres
de
Conférences

J. FALGUEIRETTES	Minéralogie.
L. EUZET	Zoologie.
C. ROUMIEU	Mathématiques.
J. PERETTI	Physique.
M. MATTAUER	Géologie.
P. CAILLON	Physique.
J. REMY	Géologie.
G. TOURNE	Chimie minérale.
H. ANDRILLAT.....	Astronomie.
VERNET-CORNUBERT (Mme).	Biologie animale.
A. BONNET	Botanique.
P. DEMANGEON.....	Géologie.
E. GROUBERT	Physique.
H. CHRISTOL	Chimie.
LAFON (Mme)	Mathématiques.
J. ROUZAUD	Chimie.
COLSON-GUASTALLA (Mme).	Biologie physico- chimique.
J.P. LAFON	Mathématiques.
A. STEINER	Psycho-physiologie.
G. LAMATY	Chimie.
C. DELOUPY	Physique.
L. GRAMBAST	Botanique.
A. MARTINEAU	Mathématiques.

MM.

Chargé d'En-
seignement

M. LEFRANC	Mathématiques.
------------------	----------------

Secrétaire principal : E. SIAU.

A Monsieur le Professeur P. FAVARGER qui nous a accueillie dans son laboratoire et nous a initié à ce domaine de la science auquel il consacre tant d'efforts. Ce travail a été effectué sous sa haute direction et il n'a cessé de nous guider avec sa bienveillance et son enthousiasme habituels.

A Monsieur le Professeur E. KAHANE qui nous a fait le grand honneur de présider cette thèse. Nous lui sommes particulièrement reconnaissante de ses riches enseignements distribués avec autorité, intelligence et rigueur. Si notre séjour dans son laboratoire fut bref, il n'en sera pas moins fructueux.

Nous remercions le Professeur I. ASSENMACHER et Madame H. COLSON-GUASTALLA, maître de conférences, qui ont accepté de juger ce travail et nous ont prodigué leurs conseils.

A la mémoire de mon père.

*A ma mère, nous lui exprimons toute notre
reconnaissance.*

A toute ma famille.

A mes amis.

INTRODUCTION

Il existe dans chaque tissu et pour chaque espèce animale, un certain nombre de protéines dont la composition en acides aminés est rigoureusement déterminée, elle est donc inscrite dans le patrimoine héréditaire. Aucune mesure diététique ne peut influencer cette composition qui dérive essentiellement d'une synthèse in situ, à partir des acides aminés circulants.

La situation est bien différente pour la composition en acides gras des divers lipides tissulaires. Des variations considérables peuvent être introduites en modifiant le régime, et chacun connaît la vieille expérience des chiens nourris avec de l'huile de lin dont les graisses devenaient liquides.

Il est cependant de connaissance notoire que dans des conditions physiologiques, la composition en acides gras est à peu près constante au sein d'une espèce animale. De fréquents exemples sont rapportés dans la littérature : présence d'acides plus désaturés dans les graisses sous-cutanées que dans les graisses péri-rénales, ou encore richesse en acide stéarique et en acides polydésaturés des phospholipides par rapport aux triglycérides. Enfin, l'impossibilité d'enrichir indéfiniment les graisses de réserve ou surtout les phospholipides cytoplasmiques en un acide gras déter-

miné, fait apparaître plus nettement encore la capacité de régulation de l'organisme animal.

Quels sont les facteurs qui entrent en jeu pour réaliser cette homéostasie? tel se pose le problème.

Les différents acides gras proviennent soit du régime, soit de la biosynthèse, soit encore des interconversions comme l'élongation d'un acide pré-existant, l'hydrogénation d'un acide désaturé, ou surtout la déshydrogénation d'un acide saturé. Plusieurs mécanismes, par lesquels un organisme modifie la composition des acides gras de ses réserves, peuvent être envisagés : sélection des acides gras alimentaires, transformation en un autre d'un acide trop abondant, synthèse préférentielle d'un acide gras déficitaire, ou encore combustion accélérée d'un acide gras trop richement représenté. Il se peut enfin que ces différents moyens d'adaptation entrent tous en action simultanément.

La nécessité d'une régulation de la lipogenèse n'apparaît pas à priori, puisque la synthèse des graisses sert principalement à mettre en réserve les calories disponibles et cela le plus rapidement possible, même au prix d'une synthèse mal adaptée.

La combustion accélérée d'un acide gras trop richement représenté peut permettre d'obtenir la composition la plus favorable à une espèce ou à un individu déterminé.

Des phénomènes d'interconversions peuvent complé-

ter cette régulation, aidés dans cette fonction par la mobilisation des acides gras des réserves.

L'étude de l'influence du régime sur la synthèse immédiate doit nous permettre de voir si cette dernière, intervient in vivo comme facteur de régulation lorsque la répartition des acides gras dans les graisses de réserve est perturbée par un régime prolongé et déséquilibré.

Au moyen d'acétate 1^{14}C il nous sera aisé d'évaluer la quantité des acides gras préférentiellement néoformés.

Nous nous proposons d'approfondir deux points :

- La prépondérance d'un des mécanismes de synthèse dans la réalisation de cette régulation. Une expérience in vitro, notamment en présence d'un inhibiteur d'un de ces mécanismes, doit nous permettre de conclure.

- La précocité ou le caractère tardif de cette régulation.

Les modifications introduites dans les graisses de réserve par le régime, constituent le terrain indispensable à l'étude d'une régulation en relation avec la mobilisation des acides gras. Des expériences d'incubation, nous permettront de voir s'il y a un départ sélectif des acides gras vers le milieu.

L'étude de la radioactivité, provenant de la combustion d'acides marqués, et, retrouvée dans le gaz

carbonique respiratoire de souris enrichies ou carencées en un acide gras, nous renseignera, en fonction du temps, sur le rôle du catabolisme dans le rétablissement d'une composition normale des graisses constitutives.

Nous compléterons l'étude des facteurs de régulation, dont l'action éventuelle se manifesterait sur la répartition des graisses constitutives, par l'examen des phénomènes d'interconversions se produisant comparativement chez des animaux appauvris ou enrichis en acide gras. Pour cela nous examinerons le devenir d'un acide marqué dans les graisses constitutives, 24 h après son administration par voie orale.

Après l'exposé de quelques techniques générales utilisées, qui feront l'objet de notre premier chapitre, nous parlerons tout d'abord de l'influence du régime sur la synthèse immédiate des acides gras à partir d'acétate 1- ^{14}C . (2e chapitre). Dans un troisième chapitre, nous rendrons compte de quelques expériences sur la mobilisation des acides gras du tissu adipeux à la suite de divers régimes. Nous verrons enfin de quelle manière les modifications de la composition des graisses alimentaire influencent la dégradation des acides gras et leurs interconversions.

*

TECHNIQUES GÉNÉRALES

EXTRACTION DES ACIDES GRAS

Après ablation du foie, les souris sont immédiatement fixées par immersion dans une solution alcool-potassique à l'ébullition, renfermant un poids de KOH égal au demi-poids de l'animal. La saponification dure quatre heures. Les savons ainsi formés vont être transformés en acides gras. Ceux-ci sont alors extraits.

Cette extraction s'effectue en trois temps :

1° Élimination de l'insaponiable en milieu alcalin

Une ampoule à décantation est rincée au moyen d'éther de pétrole. Le contenu de l'erlenmeyer ayant servi à la saponification est décanté dans cette ampoule, en omettant toutefois de transvaser les débris solides qui s'y trouvent. Ceux-ci seront repris ultérieurement avec de l'acide chlorhydrique concentré, qui en dissout la majeure partie, et additionnés à la solution précédente après que l'acidification aura eu lieu.

Un volume d'eau égal au volume d'alcool employé dans la saponification est ajouté. Quelques gouttes de phénolphthaléine nous permettent de vérifier l'alcalinité de la solution.

L'ensemble est additionné d'éther de pétrole de manière à avoir $\frac{1}{3}$ d'eau, $\frac{1}{3}$ d'alcool, et $\frac{1}{3}$ d'éther de pétrole. Après une agitation vigoureuse, sous

courant d'eau si la température est élevée, l'ampoule est laissée au repos jusqu'à ce que les deux couches soient limpides, ce qui nécessite un temps variable. Une deuxième ampoule reçoit la couche inférieure. L'éther de pétrole renfermant l'insaponifiable qui ne nous intéresse pas ici, est jeté. Une seule extraction suffit pour éliminer l'insaponifiable.

2° Extraction proprement dite des acides gras, après acidification.

Il reste un trouble sur les parois de la première ampoule. Pour l'entraîner l'ampoule est agitée en présence d'acide chlorhydrique concentré que l'on fait couler dans la deuxième ampoule et qui a pour effet de décolorer la solution qu'y est contenue. Un excès d'acide est ajouté. Deux autres rinçages sont encore effectués successivement, l'un à l'eau, l'autre à l'éther de pétrole. Ces liquides sont réunis au liquide précédemment acidifié, auquel sont jointes également les portions insolubles que nous avons mises de côté, lors de l'extraction de l'insaponifiable. Après égalisation des volumes respectifs eau-alcool (l'alcool ayant servi au rinçage de l'erlenmeyer dans lequel étaient conservées les particules solides), une nouvelle fraction d'éther de pétrole, toujours dans les mêmes proportions, leur est additionnée. Une agitation est effectuée. La séparation est cette fois quasi immédiate. La couche aqueuse est soutirée et l'éther de pétrole, qui contient les acides gras,

conservé. Une nouvelle extraction à l'éther de pétrole est effectuée sur la couche hydroalcoolique. Dès la séparation, la couche aqueuse est jetée et la couche éther de pétrole réunie à la précédente. Les parois de l'ampoule, contenant les acides gras, sont rincées avec un peu d'eau pour entraîner au fond l'hydrosoluble qui aurait pu rester et l'éliminer. On répète cette opération 3 fois.

3° Lavage des acides :

Une solution saturée d'acétate de sodium non marquée est préparée. Deux ml environ de cette solution sont introduits dans l'ampoule contenant l'éther de pétrole afin d'éliminer l'acide acétique marqué provenant de nos expériences, qui n'aurait pas eu le temps d'être métabolisé et que les acides gras auraient pu entraîner. Un mélange eau-alcool à quantités égales, est ajouté. L'ensemble est agité. Après repos, lorsque la solution inférieure est limpide, la couche hydroalcoolique est jetée. A ce moment, les acides gras sont débarrassés de leur solvant par évaporation sous courant de CO_2 et pesés.

HYDROXYLATION

Les acides gras monoéthéniques sont dihydroxylés (les diéthéniques étant tétrahydroxylés), selon la technique de Bergström et Paäbo (1) légèrement modifiée, afin de séparer les acides non saturés (hydroxytables) des acides saturés. Après dessiccation des aci-

des, les réactifs suivants : acide formique, formiate d'éthyle, eau oxygénée, sont ajoutés. Les quantités utilisées par gramme d'acides gras, sont les suivantes :

- 5 ml d'acide formique à 99%,
- formiate d'éthyle, assez pour qu'aucun précipité immédiat ne se forme, ce qui permet dans nos expériences, d'éviter l'agitation recommandée par les auteurs,
- 1 ml eau oxygénée à 30%.

Le mélange est maintenu à 40° pendant 4 heures par un bain thermostatisé. La solution est ensuite transvasée quantitativement au moyen d'une solution de soude 3N qui servira à effectuer une saponification de 3 heures, réalisée sur un bain-marie bouillant. Celle-ci est destinée à hydrolyser le dérivé époxy intermédiaire ou les diesters formiques obtenus par réaction de l'acide performique ($H_2O_2 + HCOOH$) sur la double liaison.

Les acides saturés sont séparés des hydroxylés par deux extractions à l'éther de pétrole en milieu chlorhydrique.

Des indices d'iode de vérification ont montré que l'hydroxylation était totale.

La solution d'éther de pétrole est filtrée pour éliminer les quelques particules d'acides hydroxylés en suspension. Les différents extraits sont réunis et évaporés sous courant de gaz carbonique.

Les hydroxylés sont dissous dans l'acétate d'éthyle puis après élimination du solvant, ils sont pesés. Des corrections doivent être effectuées sur ce poids, d'une part après chromatographie, une quantité de l'ordre de 10% étant entraînée avec les acides saturés, et d'autre part, parce qu'il s'agit ici d'acides di ou tétrahydroxylés et non d'acides libres. Compte tenu de ces corrections, ce poids est comparable à celui obtenu pour les non saturés par soustraction du poids d'acides saturés au poids d'acides gras totaux.

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

1° Principe

Une chromatographie sur colonne en phase inversée (technique de Howard et Martin) est utilisée pour la séparation des différents acides saturés (2).

Le support inerte constitué par l'hyflopercel est rendu hydrofuge par des vapeurs de dichlorodiméthylsilane. Une phase non polaire (huile de paraffine) est alors fixée sur ce support. La solution d'acides gras à analyser est versée à la partie supérieure de la colonne. L'élution est effectuée par des mélanges acétone-eau (phase mobile polaire), contenant respectivement 60, 65, 70 et 75 pour 100 d'acétone. Les acides gras vont se séparer suivant leur coefficient de partage entre la phase fixe et la phase mobile leur correspondant. En effet, on peut considérer qu'il y a autant de phases mobiles que de mélanges, chaque mélange n'éluant qu'un seul acide.

Les acides courts migrent avant les acides à chaînes plus longues.

2° Technique

a) Données numériques :

Colonne - Diamètre : 2,5 cm
- Longueur : 50 cm
- Verre fritté : G₁
- Hauteur de la poudre : 35 à 40 cm
microburette de 2 ml au 1/100^e de ml.

b) Préparation de la poudre :

300 g d'hyflosupercel sont mis à l'étuve à 110° pendant 24 heures. La poudre refroidie est ensuite placée en présence de vapeurs de dichlorodiméthylsilane dans un récipient étanche. On laisse en état 2 à 3 jours en agitant de temps en temps pour favoriser l'imprégnation de la substance par les vapeurs. On lave avec du méthanol jusqu'à disparition complète de l'acidité (bleu de bromothymol). Le méthanol imbibant la poudre est éliminé par chauffage à 80°. 267 ml d'huile de paraffine sont ensuite incorporés à cette poudre.

On chauffe au bain-marie jusqu'à poids constant.

c) Chromatographie proprement dite :

La poudre mise en suspension dans le mélange acétone-eau 70% est versée dans la colonne. Trois heures après, l'excès de solvant qui surnage à la surface de la colonne est enlevé et remplacé par le mélange à

analyser dissous dans de l'acétone-eau à 65% (à raison de 1 mg pour 0,7 ml de solvant). L'échantillon écoulé, on élue successivement par des mélanges acétone-eau à proportion croissante en acétone. Tous ces mélanges acétone-eau sont préalablement saturés d'huile de paraffine.

Le mélange acétone-eau 60% nous permet l'isolement de la fraction hydroxylée qui était restée dans les acides saturés après séparation. Le passage des mélanges à 65%, 70% et 75% isole successivement les acides myristique, palmitique et stéarique.

On recueille l'éluat par fractions de 15 ml et on titre par de la potasse N/100 dans du méthanol, en présence de bleu de bromothymol et sous courant d'azote.

Les conditions décrites ci-dessus sont destinées à des échantillons inférieurs à 100 mg. Si la prise d'essai est supérieure, la séparation s'avère moins bonne et il est alors nécessaire d'utiliser des mélanges moins riches en acétone. Une séparation particulièrement efficace est réalisée par l'utilisation exclusive du mélange à 65%, mais elle a comme inconvénient de prolonger considérablement la manipulation qui, dans le premier mode opératoire, n'excède pas deux heures.

d) Récupération des acides élués :

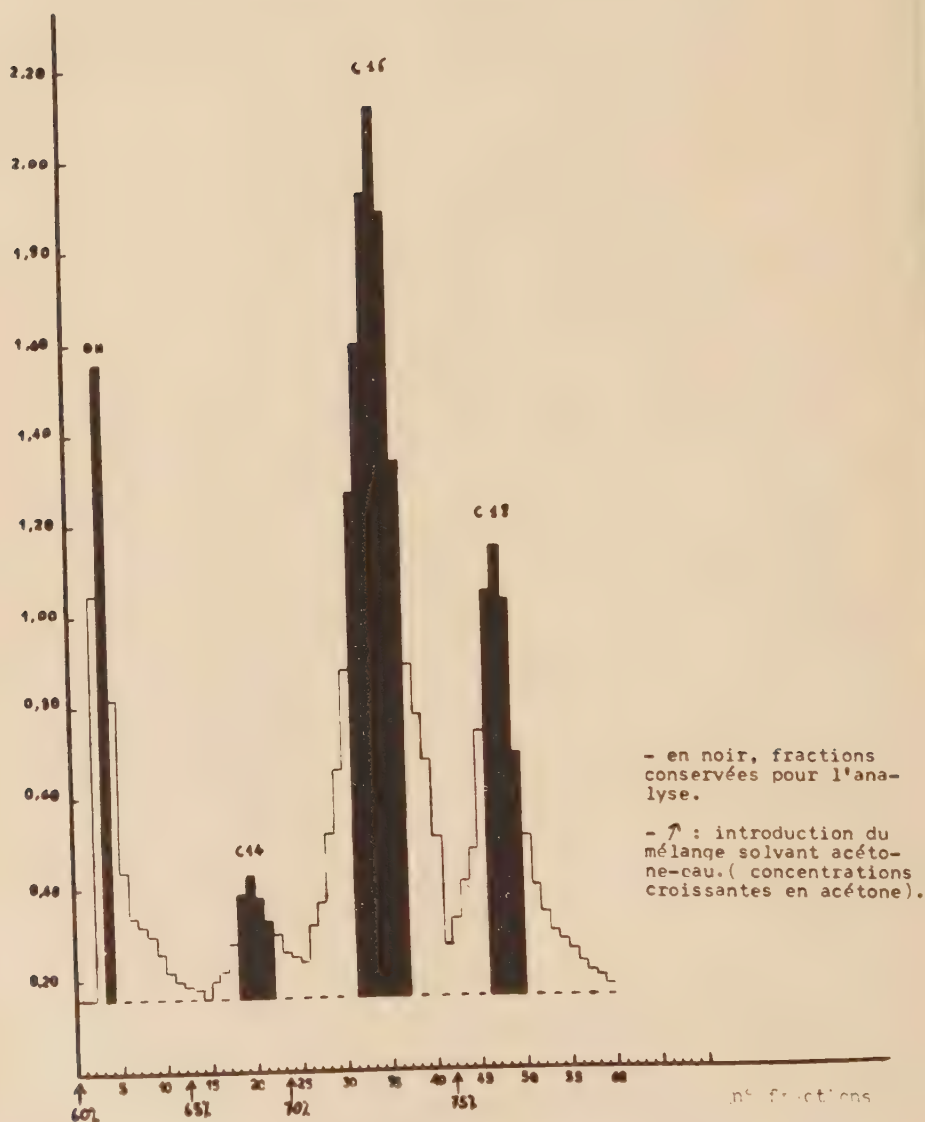
Les fractions correspondant à la partie centrale des pics sont conservées (Cf. figure 1).

Après évaporation de l'acétone, une première ex-

ml de
KOH.

Chromatographie sur colonne, type.

Figure 1.



traction à l'éther de pétrole est entreprise en milieu alcalin, afin d'éliminer la paraffine qui a pu être entraînée au cours de l'opération. Puis après acidification par l'acide chlorhydrique, chaque acide subit une extraction identique à celle effectuée pour l'obtention des acides totaux.

3° Calcul de la répartition des différents acides.

a) Principe :

La proportion des différents acides gras est calculée à partir des quantités de potasse qui ont servi à les neutraliser. Ces chiffres, déduction faite de la somme des témoins correspondants (le témoin étant la quantité de KOH nécessaire à neutraliser 15 ml de solvant pur), sont traduits en poids des acides gras par multiplication du volume trouvé par le poids moléculaire de l'acide correspondant, et division par 100.

La somme de ces différents poids est effectuée et le pourcentage de chaque acide déterminé.

b) Exemple :

Chromatographie sur colonne des acides gras saturés d'une souris (n° 276) ayant reçu pendant 10 jours un régime sans graisse. Les chiffres suivants indiquent les quantités de potasse utilisées pour neutraliser les acides gras des différentes fractions de 15 ml, successivement éluées.

N° fractions d'éluates	ml de KOH N/100						
1	0,17	18	0,25 ↓	35	0,91	52	0,27
2	0,17	19	0,17	36	0,83	53	0,29
3	0,60 ↑	20	0,25 ↑	37	0,76	54	0,32
4	1,04	21	0,30	38	0,67	55	0,35
5	0,65	22	0,37	39	0,60	56	0,38
6	0,32	23	0,44	40	0,53	57	0,41
7	0,25	24	0,50	41	0,45	58	0,43
8	0,20	25	0,58	42	0,37	59	0,46
9	0,17	26	0,66	43	0,30	60	0,47
10	0,17	27	0,72	44	0,25	61	0,48
11	0,17	28	0,79	45	0,21	62	0,42
12	0,17	29	0,86	46	0,19	63	0,39
13	0,17	30	0,90	47	0,17	64	0,36
14	0,20 ↑	31	0,93	48	0,20 ↑	65	0,32
15	0,22	32	0,97	49	0,21	66	0,28
16	0,25	33	1,00	50	0,23	67	0,25
17	0,27	34	0,97	51	0,25	68	0,22
						69	0,20

Acides hydroxylés

Acide palmitique

Acide myristique

Acide stéarique

Proportion des différents acides

3,06 ml de KOH N/100 sont nécessaires, pour titrer en totalité, la fraction des acides hydroxylés entraînés par les acides saturés contenus dans les fractions 3 à 8.

Le titrage du témoin a nécessité 0,17 ml de KOH N/100. Puisque les hydroxylés étaient contenus dans 6 fractions, le témoin total = $0,17 \times 6 = 1,02$, doit donc être ôté des 3,06 ml de potasse. Il reste : $3,06 - 1,02 = 2,04$ ml de KOH qui ont réellement servi à neutraliser les hydroxylés.

En opérant de la même manière pour les différents acides, les quantités de potasse utilisées étaient les suivantes;

- acide myristique : $1,19 - (0,17 \times 5) = 0,34$
- acide palmitique : $15,31 - (0,17 \times 27) = 10,72$
- acide stéarique : $7,19 - (0,17 \times 22) = 3,45$

En tenant compte des poids moléculaires respectifs de chaque acide leur poids en milligrammes était obtenu , pour :

le myristique : $228 \times 0,34 = 77,52/100 = 0,77$ mg

le palmitique : $256 \times 10,72 = 2684,32/100 = 26,84$ mg

le stéarique : $284 \times 3,45 = 979,80/100 = 9,79$ mg

dont la somme, (= somme des acides saturés) est

37,4 mg.

Ce qui donne en pourcentage :

myristique : 1,8%

Palmitique : 74,3%

stéarique : 23,9%

Nous avons choisi 280 pour toutes les chromatographies, sans tenir compte du détail de la composition des acides non saturés étant donné l'approximation de la méthode.

$$\text{Acides hydroxylés : } \frac{280 \times 2,04}{100} = 5,71 \text{ mg}$$

Il restait donc environ 13% d'acides non saturés dans les acides gras passés sur la colonne :

$$\text{d'où } 5,7 + 37,4 = 43,1$$

$$\frac{5,7 \times 100}{43,1} \sim 13\%$$

PREPARATION ET EXTRACTION DES ESTERS METHYLIQUES

La transformation des acides gras en esters méthyliques, en vue de la chromatographie gaz-liquide, était particulièrement indiquée lorsque nous ne disposions que de peu de substances, comme c'était le cas dans nos essais d'incubation (3).

Le mélange à méthyler, soigneusement séché, est introduit dans un ballon rodé de 25 ml, avec 5 ml de

méthanol sec (large excès) et 0,25 ml d'acide sulfurique concentré, par g d'acides gras puis le liquide est porté à ébullition à reflux doux pendant 2 heures.

Le méthanol est séché par 5% d'ébullition en présence de 5 g de magnésium et 0,5 g d'iode pour 50 à 75 ml de CH_3OH et distillation.

Le mélange méthylé est transvasé dans une ampoule à décantation au moyen d'eau distillée et d'éther de pétrole. Deux lavages successifs à l'eau sont effectués pour éliminer l'acide sulfurique et le méthanol. Un mélange méthanol-eau 1/1/ est ajouté, ainsi qu'une goutte de potasse diluée, en présence de phénolphtaléine, pour saturer et éliminer la faible quantité d'acides gras non estérifiés. Après agitation et séparation, la couche aqueuse est jetée. Les dernières traces de potasse sont entraînées par deux nouveaux lavages à l'eau. Un dernier lavage au mélange alcool-eau 1/1 est réalisé. Le dissolvant des esters méthyliques est évaporé et les esters méthyliques pesés.

CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE

1° Principe

Une colonne garnie d'un support inerte imprégné de liquide fixe reçoit le mélange volatil d'esters méthyliques à analyser, qui migrent différentiellement sous l'action d'un courant de gaz inerte.

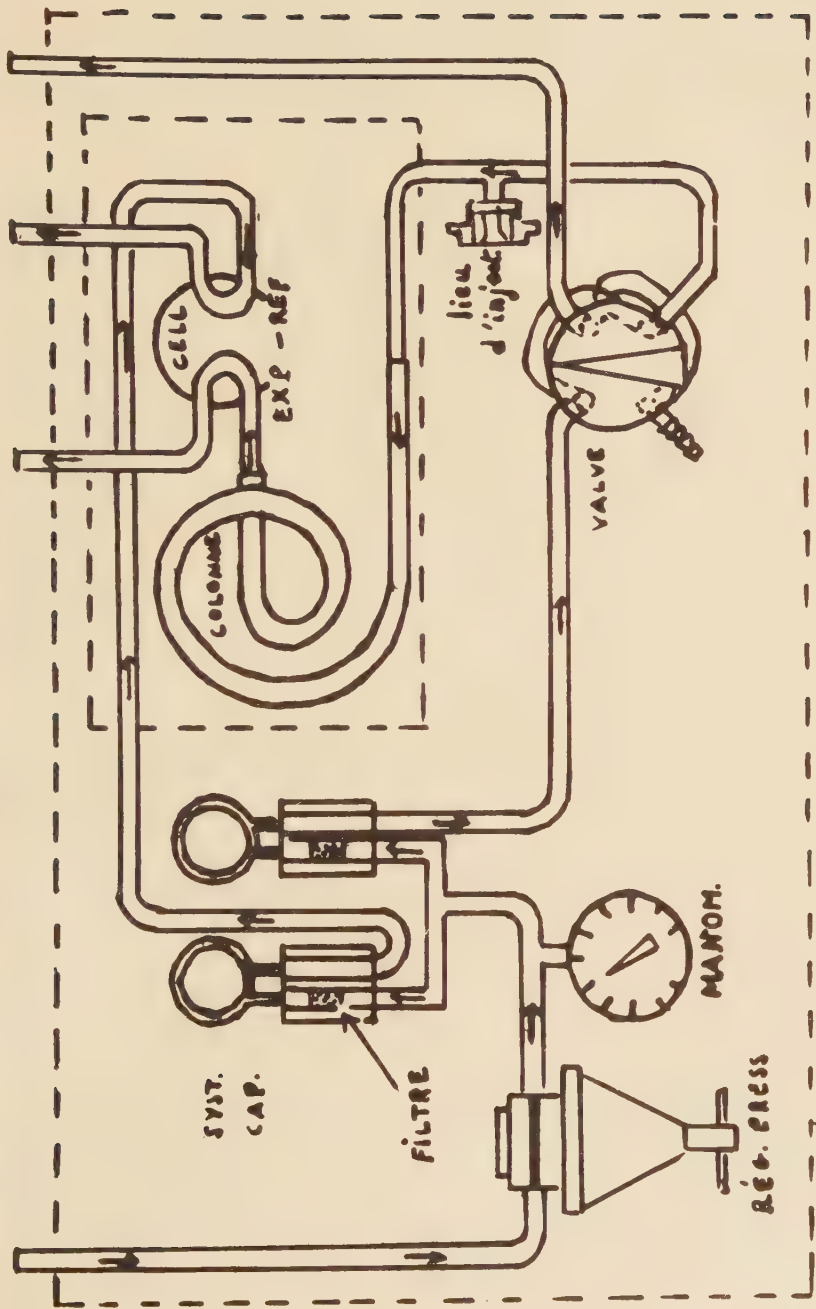
2° Technique

a) Description de l'appareil : Le chromatographe utilisé est un Beckman du type GC2. (Voir schéma).

Il comprend :

- une réserve de gaz comprimé (gaz vecteur);
- un détendeur, un manomètre et un système capillaire qui maintiennent un flux constant. Ce système capillaire est double. Placé sur le trajet du gaz vecteur, celui-ci emprunte simultanément deux voies différentes, une en relation avec le côté référence du détecteur, l'autre traversant la colonne;
- un mécanisme permettant la vaporisation instantanée de l'échantillon liquide, dès son introduction, dans une chambre prévue à cet effet;
- une colonne dans son thermostat.

Gaz vecteur



- un détecteur à deux voies : c'est une cellule de conductibilité thermique, comparant les propriétés du gaz vecteur pur (Réf.) à celle du gaz chargé de soluté (Exp.).

Principe :

Un filament dont la conductibilité présente un coefficient de température élevé est maintenu au centre d'un petit bloc de métal à travers lequel passe le gaz et il est chauffé par un courant électrique constant. La température atteint une valeur constante qui dépend de l'intensité du courant électrique, de la résistance du filament, de la température du bloc et du débit de gaz. Si le bloc est maintenu à une température inférieure à celle du filament, de la chaleur passe du filament au bloc, dans une mesure qui dépend de la conductibilité du gaz et de la différence de température entre les parois du bloc et le filament.

Quatre filaments, présentant les caractéristiques ci-dessus décrites, peuvent constituer les quatre résistances d'un pont de Wheatstone, et être utilisés à des fins de détection, deux des filaments étant au sein du gaz vecteur pur (côté de référence du détecteur), les deux autres du gaz chargé de soluté (côté sensible ou expérimental du détecteur).

Si les deux côtés de la cellule (ou bloc) sont remplis avec le même gaz et que le même courant soit appliqué à tous les filaments, le pont de Wheatstone est équilibré et aucun signal n'est donné. Mais si le gaz de la région sensible est modifié, s'il est chargé

de vapeurs d'esters méthyliques d'acides gras, on enregistre une différence de potentiel puisque le pont de Wheatstone n'est plus en équilibre, les conductibilités n'étant plus les mêmes.

- Un dispositif d'enregistrement.

b) Renseignements généraux :

Colonne : Longueur. 6,20 m

Diamètre: 0,5 cm

Forme: spiralee

Matière: acier

Nature du support : Polyéthylèneglycoladipate + pentaérythrytol (phase stationnaire) sur brique pilée.

Nature et pression du gaz vecteur : L'hydrogène a été choisi comme gaz vecteur, à la pression de 2 kg/cm² pour un débit de 120 ml à la minute.

Intensité de courant dans le détecteur : Le détecteur était alimenté par un courant de 500 milliam-pères.

Temps de chauffage : L'appareil doit être chauffé 1 à 2 heures avant l'injection (une température de 210° était choisie) afin que la stabilité thermique en soit réalisée alors que 30 minutes suffisent en général pour stabiliser l'enregistreur.

c) Chromatographie proprement dite : Une injection de 1 mm³ au travers d'une membrane d'élastomère permet l'introduction dans la chambre de vaporisation, du mé-

lange d'esters méthyliques que l'on veut séparer. Celui-ci, entraîné par le gaz vecteur, va se scinder en ses divers constituants, qui vont migrer différenciellement selon leur répartition entre la phase stationnaire et la phase mobile (gaz vecteur), conséquence immédiate des différences individuelles de coefficients de partage.

Les différents esters sont entraînés par le gaz vecteur jusqu'à l'orifice de sortie après passage dans un détecteur qui permet leur identification et leur dosage.

3° Mode de calcul

L'estimation de la surface des pics se fait à partir de la valeur obtenue pour la surface des triangles correspondants que l'on considère comme proportionnelle à la concentration.

Les dimensions utiles : base et hauteur du pic, sont corrigées en fonction des déflexions trop lentes ou trop brutales de la courbe. On additionne les résultats trouvés pour chaque pic et on détermine alors le pourcentage de chaque acide. Surface des différents pics : (Cf. figure 2).

$$\text{myristique : } \frac{1,2 \times 1}{2} = 0,60$$

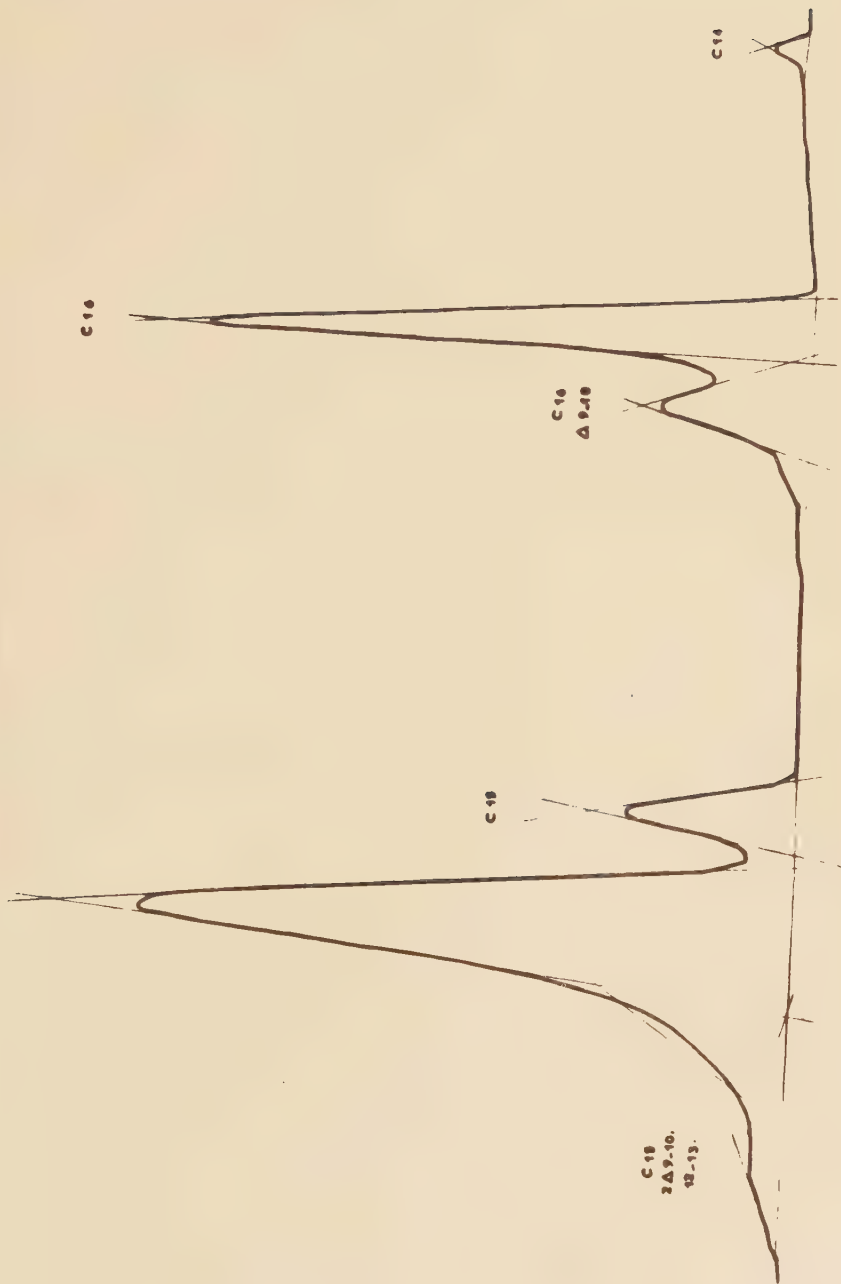
$$\text{palmitique : } \frac{1,8 \times 16,4}{2} = 14,76$$

FIGURE II

CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE.

(série n° 276)

C 10
 $\Delta 9.10$



$$\text{palmitoléique : } \frac{2,6 \times 4}{2} = 5,2$$

Nous répartirons à égalité entre ces deux acides, la surface intermédiaire non évaluée, dans le calcul précédent, soit :

$$\frac{1,7 \times 0,6}{2} = 0,51$$

La surface du pic palmitique devient :

$$14,76 + 0,26 = 15,02$$

Celle du palmitoléique :

$$5,2 + 0,25 = 5,45$$

Valeur du pic stéarique en première approximation :

$$\frac{1,8 \times 4,9}{2} = 4,41$$

Pour l'oléique, nous trouvons de-même :

$$\frac{3,7 \times 18,2}{2} = 32,47$$

Surface du triangle intermédiaire ;

$$\frac{0,5 \times 1,1}{2} = 0,25$$

Valeur définitive du pic stéarique :

$$4,41 + 0,12 = 4,53.$$

Du fait du ralentissement de la pente de la courbe de descente de l'acide oléique et de sa mauvaise séparation avec l'acide linoléique, un triangle supplémentaire doit lui être attribué :

$$\frac{2,3 \times 4,8}{2} = 5,02$$

Surface réelle de l'oléique :

$$32,47+5,02+0,12 = 37,61$$

Nous avons en pourcentage d'acides gras totaux :

myristique	1,1%
palmitique	21,0%
palmitoléique	7,6%
stéarique	6,3%
oléique	52,7%
linoléique	11,3%

dont 28,4% sont constitués par des acides saturés, répartis comme suit :

myristique	3,9%
palmitique	74,0%
stéarique	22,1%

4° Comparaison des résultats obtenus en chromatographie gaz-liquide et en chromatographie sur colonne.

La séparation des acides saturés et non saturés à même nombre d'atomes de C n'était pas excellente, notamment en ce qui concerne les acides palmitique et palmitoléique et les acides stéarique et oléique. Cependant la comparaison des résultats obtenus en chromatographie sur colonne et en chromatographie gaz-liquide s'est avérée assez satisfaisante. En effet nous observons peu de différences entre les pourcentages de palmitique et de stéarique obtenus par l'une

ou l'autre méthode, seuls les résultats concernant le myristique diffèrent notablement. Sur plusieurs chromatographies de comparaison, l'acide myristique était plus abondant au chromatographe gaz-liquide que dans les chromatographies sur colonne.

Nous reproduisons les résultats obtenus par les deux méthodes :

Chromatographie sur colonne

C 14	1,8%
C 16	74,3%
C 18	23,9%

Chromatographie gaz-liquide

C 14	3,9%
C 16	74,0%
C 18	22,1%

TECHNIQUES RADIO-ISOTOPIQUES

1° Principe

Le C^{14} émettant un rayonnement β de faible intensité, le choix d'un compteur Geiger-Müller sans

fenêtre paraissait tout indiqué. L'échantillon déposé dans des cupules est introduit directement dans une enceinte remplie d'un gaz qui en l'absence de rayonnement ionisant isolerait les deux électrodes du compteur de Geiger-Müller.

Sous l'influence du rayonnement β le compteur reçoit des impulsions dont le nombre est proportionnel à l'intensité de ce rayonnement.

Les impulsions produites par minute, pour pouvoir être enregistrées par le compteur, doivent être peu nombreuses. D'où l'emploi d'un démultiplicateur électronique ou "scaler" pour réduire leur nombre avant leur introduction dans l'appareil de comptage.

Un dispositif spécial permet l'étalonnage de notre appareil de manière à ce qu'il enregistre non les impulsions produites par minute, mais le temps que met une substance marquée à émettre un nombre d'impulsions données que l'on choisit arbitrairement, suivant la quantité de radioactivité supposée dans l'échantillon : soit 100, 200, 600, 1.000, 3.000, 10.000 coups ou plus.

2° Techniques opératoires

a) Préparation des échantillons : Par évaporation lente par chauffage aux rayons infra-rouges d'une solution alcoolique (0,3 ml environ), les acides gras sont déposés en couche mince dans des cupules d'aluminium tarées, préalablement décapées par traitement à l'acide nitrique et à la potasse.

b) Description de l'appareil : Leur activité est alors mesurée au moyen d'un compteur à gaz sans fenêtre placé sur le trajet de 25 cupules contenant les échantillons dont la radioactivité sera ainsi successivement mesurée de façon automatique. Le gaz ionisé, ici, l'hélium-isobutane (1% d'isobutane) arrive par le sommet de la chambre de comptage, passe sur la cupule et emprunte un orifice situé à la partie supérieure des tours pour aller barboter dans un flacon contenant une huile siliconée.

Cet instrument est en connection avec un panneau de contrôle, une échelle et l'appareil enregistreur qui note automatiquement le numéro d'ordre et le temps de comptage de chaque cupule.

3° Méthode de calcul

a) Calcul des activités spécifiques : Le temps de comptage de chaque cupule, inversement proportionnel à une quantité déterminée de radioactivité, est

obtenu par simple lecture sur l'enregistreur. Le nombre de coups choisi arbitrairement sur l'appareil est alors divisé par la moyenne des résultats obtenus sur cet appareil pour 10 passages successifs de la cupule dans la chambre d'ionisation. De ce résultat, est déduite l'activité trouvée pour le mouvement propre de l'appareil, activité due aux contaminations extérieures (rayons cosmiques) et déterminée au moyen d'une cupule de référence de radioactivité nulle. Ici, sa valeur était d'environ 40. On divise ensuite ce résultat par le poids d'acide gras contenu dans la cupule, exprimé en milligrammes, compte tenu d'un facteur correctif établi pour des quantités croissantes d'acides gras. Ce chiffre multiplié par 100 nous donne l'activité spécifique.

b) Calcul des activités totales : Connaissant le poids des acides gras totaux, il est aisé d'en déduire l'activité totale, par simple multiplication de ce poids, exprimé en milligrammes, par l'activité spécifique.

*
* *

INFLUENCE DES ACIDES GRAS DU REGIME
SUR LA SYNTHÈSE DES DIFFÉRENTS ACIDES GRAS
CHEZ LA SOURIS

1° Introduction

De prime abord et si on se rappelle l'objet de notre étude, un tel titre mérite justification. Il apparaît assez contradictoire en effet d'étudier la régulation d'un équilibre dont on présuppose la labilité. L'existence de cet équilibre ne peut être cependant contestée si on se place dans certaines limites. Effectivement, nous avons déjà mentionné que si dans des conditions physiologiques la régulation s'effectue convenablement et si les taux des différents acides gras sont constants, il n'en est pas de même lorsqu'un organisme reçoit une surcharge prolongée en un acide déterminé. Les mécanismes régulateurs sont alors dépassés et on assiste à un accroissement du stock de cet acide dans les graisses constitutives.

Cette constatation nous autorisait à utiliser divers types de régime, pour carencer ou au contraire

enrichir tout à loisir l'organisme d'un animal en un acide donné et voir si en conséquence, la mise en action des facteurs de régulation, était immédiate ou tardive et sous la dépendance ou non de la nature et de la quantité d'acides gras préexistants.

Deux idées directrices sont à la base de l'hypothèse de travail.

La première, d'ordre général, nous incite à rechercher une action éventuelle des modifications des graisses du régime sur la synthèse globale des acides gras.

La deuxième, plus spécifique, nous conduit à l'examen de chaque acide pris en particulier : les acides gras existant chez la souris orientent-ils la synthèse vers la prépondérance de tel ou tel acide, ou plus explicitement, un excès en un acide gras va-t-il entraîner une gêne à l'élaboration de ce même acide ou exercera-t-il au contraire une action préférentielle sur sa synthèse?

Un bref rappel sur la synthèse des acides gras paraît utile pour mieux comprendre le but de notre travail et pour faciliter l'interprétation de nos résultats :

a) Rappel sur la synthèse des acides saturés :

On a d'abord tenté d'assimiler la synthèse à un processus de proche en proche, inverse du catabolisme oxydatif. Mais plusieurs arguments allaient s'éle-

ver contre cette hypothèse sans toutefois l'annihiler complètement. Nous n'en rappellerons que quatre :

1° Les acides gras à courte chaîne, administrés à l'animal ou mis en présence de coupes d'organes in vitro se dégradent en éléments en C2, avant leur transformation secondaire en acides gras à chaînes plus longues (4).

2° A l'exception de la glande mammaire, l'adjonction d'un acétyl-CoA ne peut se faire que sur des éléments possédant un nombre déjà élevé d'atomes de carbone (5).

3° La réaction ultime du cycle d'oxydation n'est pas réversible (6).

4° Les fractions cytoplasmiques de broyat de foie de pigeon qui ne contiennent pas les enzymes du cycle oxydatif ont la capacité de transformer directement l'acétyl-CoA en acide palmitique sans que les intermédiaires puissent être isolés (7).

Cette dernière réaction s'avérait déterminante pour envisager la possibilité d'un deuxième mécanisme de synthèse, entièrement distinct du mécanisme d'oxydation des acides gras, et dont les enzymes occuperaient une localisation extramitochondriale.

Ce mécanisme est appelé mécanisme de condensation par opposition au mécanisme d'élongation régi par les enzymes mitochondriaux. Il résulte de la condensation simultanée de plusieurs éléments en C2. La rapidité du processus est telle qu'elle ne permet pas aux in-

termédiaires formés de se séparer du système enzymatique jusqu'à obtention de l'acide final. Ce procédé s'accorde avec la répartition de la radio-activité retrouvée dans l'acide palmitique par exemple, après injection d'acétate 1^{14}C , que l'on trouve uniformément distribuée entre les différents carbones impairs. Un tel mécanisme présiderait principalement à l'élaboration des acides palmitique (80%) et myristique.

Les enzymes impliqués dans cette réaction sont localisés dans le cytoplasme d'où encore son appellation de système non mitochondrial.

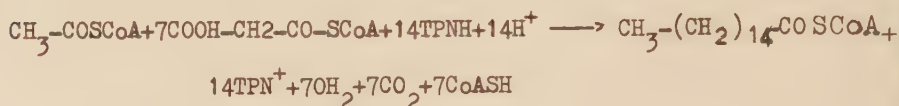
Plusieurs étapes se succèdent jusqu'à l'élaboration de l'acide gras. Une première étape indispensable est la formation du malonyl-CoA. L'acétyl-CoA-carboxylase, dont le coenzyme est la biotine, catalyse la condensation du CO_2 sur l'acétyl-CoA pour former du malonyl-CoA.



Il a été démontré également que le malonyl-CoA pouvait provenir d'autres sources que de l'acétyl-CoA. En effet, l'acétoacétyl-CoA, le succinyl-CoA et l'acide propionique auraient également été reconnus comme précurseurs.

L'acétyl-CoA est nécessaire pour que la réaction se produise, mais son absence peut être compensée par

la décarboxylation du malonyl-CoA, cette décarboxylation se produisant sous l'influence d'un enzyme dans les cas de besoin en acétyl-CoA. Le rapport du malonyl-CoA à l'acétyl-CoA pour la synthèse de l'acide palmitique est de 7/1 :



L'acétyl-CoA est incorporé dans l'acide gras final et se retrouve dans les 2 carbones les plus éloignés du carboxyle.

L'incapacité de l'acétaldéhyde à suppléer l'acétyl-CoA dans cette réaction élimine l'hypothèse de Brady (8) qui voulait voir un intermédiaire dans le premier de ces corps. Mais inversement le propionyl-CoA et à un moindre degré le butyryl-CoA et non les dérivés CoA supérieurs peuvent se substituer à l'acétyl-CoA. Cette substitution se répercutera naturellement sur le produit final, le propionyl-CoA engendrant ainsi des acides gras à nombre impair de carbone ce qui peut expliquer en partie leur présence (en petite quantité) dans l'organisme.

Les essais effectués afin d'isoler les différents stades intermédiaires de cette réaction se sont révélés infructueux, et ont été à l'origine de nombreuses hypothèses et travaux destinés à en définir l'existence et la nature. En particulier par la recherche d'un éventuel élément en C_5 qui devait résulter de la condensation d'un acétyl-CoA et d'un malonyl-CoA. Celui-

ci, quoique encore imparfaitement déterminé, serait vraisemblablement un acétomalonyl-CoA. On ne sait encore si sa réduction va de pair avec sa décarboxylation ou si elle ne se produit que plus tard sur un polycétopalmityl-CoA, comme l'a proposé Wakil. Ce composé résulterait de la condensation d'acides dicarboxyliques et serait ultérieurement réduit par TPNH en acide palmitique.

Lynen a suggéré récemment une hypothèse judicieuse rendant compte à la fois de l'existence de ces intermédiaires et de l'impossibilité de les isoler (9).

L'originalité de la théorie réside dans le fait qu'il n'existerait pas plusieurs enzymes isolés responsables des différentes étapes de la synthèse mais un système enzymatique, "synthétase", dont les divers éléments seraient rassemblés autour d'un groupement fonctionnel SH, permettant ainsi aux différents enzymes de s'emparer plus facilement des intermédiaires tenus à proximité sans qu'ils soient relâchés dans le milieu.

Cette interprétation diminuerait l'opposition entre ce mécanisme de synthèse et le mécanisme inverse de la dégradation des acides gras, la différence fondamentale restant l'unité de condensation, dans un cas malonyl-CoA, dans l'autre, acétyl-CoA.

Parallèlement au mécanisme de condensation, on décrit un mécanisme d'élongation appelé système mitochondrial du fait de la localisation de ses enzymes

dans les mitochondries. Ce système est la réplique fidèle de la β -oxydation, excepté en ce qui concerne l'étape finale de la synthèse comme nous l'avons mentionné précédemment. Les intermédiaires, libérés dans le milieu, sont dilués par les acides gras préexistants, qui peuvent également après activation fixer un groupement acétyl-CoA. Il en résulte que dans des expériences utilisant de l'acétate marqué en Cl comme précurseur, on ne pourra pas obtenir une répartition uniforme de la radioactivité dans l'acide gras nouvellement synthétisé, et que le pourcentage le plus élevé sera trouvé dans le carboxyle.

L'élongation se produit sur un acide à nombre de carbones déjà élevé et n'utilise pas le malonyl-CoA. Ce mécanisme synthétise principalement l'acide stéarique et l'acide oléique.

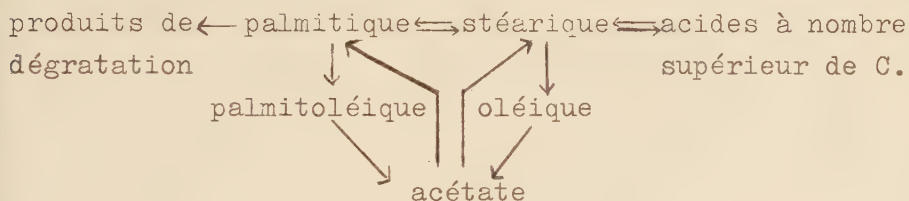
Avec une préparation de mitochondries de foie de pigeon en présence de TPNH, DPNH et d'ATP, on obtient un mélange d'acides gras renfermant : 20% d'acide laurique, 20% d'acide myristique, 20% d'acide palmitique et 40% d'acide stéarique.

Nous avons passé volontairement sous silence la première étape de cette synthèse qui, bien entendu, coïncide avec la dégradation du glucose en acétyl-CoA. Cette dégradation peut se faire, soit par l'intermédiaire de la voie oxydative, soit par la classique voie glycolytique d'Embden-Meyerhof. Au même titre, n'importe quel composé capable de former de l'acétyl-CoA peut

être considéré comme précurseur des acides gras. De plus, nos expériences ont été effectuées à partir d'acétate ^{14}C et non de glucose marqué.

b) Rappel sur la synthèse des acides gras non saturés :

Les acides gras non saturés ont été considérés depuis longtemps, comme formés principalement par désaturation des acides saturés correspondants, le palmitoléique provenant du palmitique, l'acide oléique du stéarique. Nous rappelons le schéma classique :



Des travaux plus récents ont apporté quelques précisions intéressantes sur cette transformation. Cette conversion se produit en présence de TPN^+ et des enzymes de telle ou telle fraction cellulaire et seulement sur un acide activé sous forme de dérivé acyl-CoA, ce qui n'est pas en contradiction avec la possibilité d'une hydroxylation en 9 ou 10 de l'acide saturé, à laquelle succéderait une déshydratation, comme certains auteurs l'ont suggéré. Mais des essais utilisant des acides hydroxylés marqués ont montré qu'ils étaient peu métabolisés et d'autre part, les systèmes enzymatiques d'extraits de levure débarrassés de cellules, ne peu-

vent convertir les dérivés CoA des acides hydroxy-stéariques en acides non saturés. Devant ces résultats peu concluants, et toujours avec l'idée que l'acide gras est oxygéné au cours de la désaturation, on s'est demandé si les acides monoéthéniques ne seraient pas formés à partir d'un esterphosphate. Ceci n'a pas été démontré pour la levure mais serait possible pour certains microorganismes fécaux.

Système in vivo.

2° Partie expérimentale :

1° justification des conditions choisies :

a) temps de marquage : L'originalité de notre technique d'étude réside dans le délai exceptionnellement court entre le temps où les animaux reçoivent la substance marquée et le moment où ils sont exécutés : 30 secondes, 1 minute, 3 minutes (ou 12 minutes parfois à titre de comparaison). Nous ne connaissons pas de conditions comparables dans les nombreux travaux antérieurs, relatifs à la synthèse. Il était préférable en effet, de se placer au moment le plus opportun pour éviter l'apparition de phénomènes d'interconversions ou tout autre phénomène qui auraient pu se produire simultanément et nous masquer les faits essentiels. C'est donc la synthèse seule que nous comptons atteindre par cette expérimentation.

b) nature du régime : D'autre part, nous désirions offrir aux animaux un régime tel qu'ils ne puissent choisir, déjà au niveau de l'absorption intestinale,

les acides gras qui correspondent le mieux à la composition de leurs tissus. On peut en effet, concevoir une relation de cause à effet, entre la mauvaise digestibilité de l'acide stéarique par exemple, et sa faible concentration dans les graisses de dépôt. Les propriétés physiques de cet acide s'opposent à une facile absorption et sa prédilection pour les phospholipides est peut-être due au fait que ces substances représentent le meilleur moyen de masquer et de neutraliser l'influence de ces propriétés.

De plus, une certaine adaptation se produit déjà au niveau intestinal en ce qui concerne les acides gras à courte chaîne : administrés dans le régime alimentaire, les acides lauriques et ses homologues inférieurs ne parviennent pas intégralement aux réserves car ils sont absorbés surtout par voie portale (10) et brûlés directement dans le foie.

C'est pourquoi dans nos expériences, les souris reçoivent soit un régime complètement dépourvu de graisse, soit une graisse pure, par exemple de la tripalmitine, soit encore un mélange de glycérides dépourvu de tripalmitine. Dans ces conditions, aucun choix n'est possible en ce qui concerne l'acide palmitique, au niveau intestinal.

c.) durée du régime : Une période de régime de durée modérée a été choisie, (8 à 20 jours) de façon à ne pas provoquer de modifications trop profondes des

systèmes enzymatiques et une adaptation qui ne nous permettrait plus de constater les mécanismes de l'homéostasie dans des conditions physiologiques.

Pour la même raison, la quantité de graisses administrée est aussi modérée. On sait en effet, qu'en faisant ingérer à un animal un excès important d'acides gras saturés, pendant un temps prolongé, on provoque la disparition du tissu adipeux (11). Un régime de 8 jours doit largement suffire à solliciter les mécanismes de régulation puisque ce temps dépasse la demi-durée de vie des acides gras de la carcasse chez la souris (12). Ainsi par exemple, si l'administration pendant ces 8 jours, d'un régime sans acide palmitique avait réussi à faire baisser de moitié la proportion d'acide palmitique en l'absence de synthèse, l'acide palmitique synthétisé pendant le même temps aurait suffi à rétablir la situation.

2° Déroulement des opérations :

Ces expériences comprennent cinq groupes d'essais utilisant au total environ 150 souris, qui sont soumises pendant 8 à 10 jours à des régimes variés :

- un groupe carencé totalement en lipides,
- un deuxième groupe recevant des graisses de composition voisine de celles de souris. Ces graisses prélevées sur des rats ont été incorporées au régime dégraissé. Le régime suivant constituait l'alimentation de base de nos souris :

- Protéines	:	26%	
- Graisses	:	4%	
- Cellulose	:	8%	
- Vitamine A	:	6800 UI	par kg de nourriture
- Vitamine B ₂	:	10 mg	-
- Vitamine D ₃	:	1800 UI	-
- Vitamine E	:	5 UI	-
- Niacinamide	:	15 mg	-
- Ac. Pantothén.	:	10 mg	-

L'épuisement de ce régime au Soxhlet par l'éther de pétrole, permet de la dégraisser pour satisfaire aux exigences des autres régimes. Cinq grammes sont donnés quotidiennement à chaque souris.

Le troisième groupe est pratiquement dépourvu de palmitate et contient 10% de graisses réparties comme suit :

- Trioléine + acide oléique 70%
- Tristéarine 10%
- Acide myristique 10%
- Huile de maïs 5%
- Acide linoléique 5%

qui complètent le régime dégraissé.

Le quatrième reçoit exclusivement comme graisse de la tripalmitine, soit 5, 10 ou 30% suivant les expériences.

Un cinquième et dernier groupe est nourri uniquement par de la tristéarine en complément au régime dégraissé.

Le régime est suspendu la veille au soir de l'expérience et des quantités connues réadministrées, cinq heures, trois heures et trois quarts d'heure avant l'injection, de façon que toutes les souris soient dans les mêmes conditions alimentaires. Comme elles n'absorbent pas la même quantité de nourriture lors du dernier repas, un contrôle du poids en est effectué.

On leur administre ensuite dans une veine caudale, de l'acétate 1^{14}C (en solution isotonique) et elles sont exécutées 30 secondes, 1 minute, 3 ou 12 minutes après l'injection.

Les carcasses sont alors saponifiées. Les acides gras totaux sont extraits. On détermine ensuite le poids de ces acides. Connaissant ce poids, leur comptage nous donne le chiffre de synthèse globale.

Une hydroxylation permet la séparation des acides non saturés des saturés. Ceux-ci sont chromatographiés sur colonne et les différents constituants isolés. Nous sommes ainsi renseignés sur la répartition des différents acides dans les graisses de réserve.

Les acides neutralisés par le dosage sont à nouveau extraits et leur activité spécifique déterminée. Le pourcentage de la radioactivité contenue dans chaque acide par rapport à la synthèse globale est calculé compte tenu de leurs proportions respectives données par la chromatographie.

3° Résultats et discussion

a) Influence du régime sur la répartition des différents acides gras dans les réserves :

L'influence de la composition en acides gras du régime n'avait pas à être établie ici. De nombreuses expériences l'ont déjà démontrée (13, 14, 15). Elle s'avérerait nécessaire cependant principalement pour vérifier l'efficacité du régime entrepris et pour nous renseigner sur la répartition des différents acides dont la connaissance était nécessaire pour l'interprétation de nos résultats. Les chiffres trouvés dans notre série d'expériences à 30 secondes, 1 minute et 3 minutes permettent quelques remarques générales (Cf. tableau 1).

On sait que la proportion des divers acides gras est différente dans les triglycérides, les phospholipides, les esters du cholestérol (16). Lorsque l'on analyse, comme nous l'avons fait, les acides gras totaux de la carcasse d'une souris, on doit s'attendre à trouver un excès des acides gras abondants dans les phospholipides comme l'acide stéarique, lorsque la souris est pauvre en tissu adipeux, puisque dans ce cas, la proportion de phospholipides dépasse la normale.

C'est bien ce qu'on observe pour les animaux dont la quantité totale d'acides gras s'écarte très notablement de la valeur normale correspondant au groupe envisagé. Ainsi, une souris du groupe sans graisse présentait un mauvais état général, la quantité d'aci-

Proportion des différents acides gras

dans les réserves après huit jours de régime

Régimes	Palmitique (en % des saturés)			Stéarique (en % des saturés)			Désaturés (en % des ac. gras totaux)		
	Moyennes	Ecart standard	Probabilités	Moyennes	Ecart standard	Probabilités	Moyennes	Ecart standard	Probabilités
Sans graisse	69	6,7	P<0,001	26,2	6,0	P<0,001	73,6	3,5	P<0,001
Palmitate seul	77,5	5,8	0,10<P<0,20	17,5	3,5	0,60<P<0,70	59,8	3,8	0,50<P<0,60
Sans Palmitate	65,5	4,6	P<0,001	25	5,3	P<0,001	69,8	4,4	P<0,05

Tableau 1

La probabilité a été calculée au moyen de la formule : $\sigma^2 = \frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}}{N}$

Cette probabilité indique la probabilité pour que les écarts, entre les deux séries comparées, soient dus au hasard. On admet que pour un p inférieur à 0,05, les résultats sont significatifs, c'est à dire qu'il y a une différence systématique.

N = nombre de degrés indépendants
 $\sum X$ = somme des valeurs individuelles dans une série
 $\bar{X}$ = moyenne de $\bar{X}$
 σ^2 = dispersion

des gras totaux n'atteignait alors que 0,274 g (n° 237). La proportion d'acide stéarique était la plus élevée du groupe. Ce cas extrême mis à part, on n'observe pas de corrélation entre l'état d'amaigrissement des souris et la répartition des acides gras.

Les chiffres obtenus permettent de souligner une grande variabilité de composition. En effet, la proportion d'acide palmitique dans les acides saturés s'échelonne entre 65 et 80,5% pour 15 souris dont les poids d'acides gras totaux s'établissent de 0,825 à 1,440 g. Chez les mêmes souris, la proportion des acides gras non saturés totaux dans les réserves varie également de 65 à 80%. Malgré cette dispersion, on observe sous l'influence d'un régime contenant 10% de tripalmitine (dont environ 60% sont digérés) (17) une augmentation significative ($p < 0,001$) de la proportion d'acide palmitique (moyennes 77,5% contre 69%) par rapport à des souris ayant reçu un régime sans graisse, et une baisse des acides non saturés de 73,6% à 59,8%. Mais l'accroissement d'acide palmitique dans le régime se fait ressentir principalement sur la concentration en acide stéarique qui passe de 26,2% à 17,5%. Son absence au contraire ne se traduit que par une baisse légère et à peine significative de sa proportion dans les réserves.

b) Influence du régime sur la synthèse immédiate des différents acides gras, in vivo :

Les chiffres précédents nous montrent que dans nos conditions expérimentales les souris ont réussi dans

une grande mesure à compenser l'effet du régime (témoin en est la relative homogénéité des proportions entre les acides de groupes différents), et cela sans pouvoir choisir les acides gras nécessaires à cette adaptation, leur régime leur étant imposé.

Acides saturés :

Dans une première tentative, nous avons donc examiné la possibilité d'une adaptation du mécanisme de synthèse. Le système dit non mitochondrial, isolé du foie par Wakil, forme, au moins in vitro, surtout de l'acide palmitique, alors que le système dit mitochondrial fournit un mélange complexe. Il se pouvait que la prédominance d'acide palmitique dans le régime rende moins importante la participation du système non mitochondrial et que soit favorisée la synthèse des autres acides gras. Les résultats de nos expériences (Cf. tableau n° 11) montrent qu'il n'en est rien.

La proportion de la radioactivité retrouvée dans l'acide palmitique est extrêmement variable chez les animaux nourris avec un régime sans graisse, l'acide palmitique renferme en moyenne 48% de l'activité globale des acides gras.

Lorsque les souris reçoivent un régime à 10% de tripalmitine, la proportion passe à 72,7% avec sécurité statistique de $p < 0,001$. La richesse relative du régime et des réserves en acide palmitique favorise donc la synthèse de cet acide plutôt qu'elle ne l'inhibe.

Proportions de l'activité totale retrouvée dans les acides non saturés

et dans l'acide palmitique

Régimes	Palmitique (en % de l'activité totale)	Désaturés (en % de l'activité totale)
Sans graisse	Moyennes 47,8 Ecart standard 10,6 Probabilités $P < 0,001$	Moyennes 41 Ecart standard 10,2 Probabilités $P < 0,001$
Palmitate seul	Moyennes 72,7 Ecart standard 6,9 Probabilités $0,01 < P < 0,02$	Moyennes 16,5 Ecart standard 8,8 Probabilités $P = 0,02$
Sans palmitate	Moyennes 62,8 Ecart standard 4,4 Probabilités $0,001 < P < 0,01$	Moyennes 31,4 Ecart standard 5,8 Probabilités $P = 0,001$

Avec 10%
(de graisse)

Tableau n° 2

Avec un régime dépourvu de palmitate, la synthèse de ce dernier acide est significativement plus importante qu'avec un régime sans graisse, mais elle reste inférieure à la synthèse en présence de palmitate seul.

Ce résultat paradoxal laissait supposer que l'administration d'acide palmitique seul, exigeant sa combustion préférentielle, accélérât tout son métabolisme. Cette idée, bien entendu, demandait à être vérifiée par l'expérience et c'est ce que nous rapportons dans une autre partie de ce travail.

Il y avait un autre moyen de vérifier ce premier résultat par une expérience *in vitro*. Elle fera l'objet d'un chapitre à part.

- Acides non saturés :

L'augmentation de synthèse de l'acide palmitique se fait non pas tellement au détriment de celle du stéarique, mais surtout aux dépens de la synthèse des acides non saturés (cf. tableau 3). On sait que parmi ces acides gras, l'acide oléique occupe une place bien plus importante que l'acide palmitoléique (80%, 10%) et que les acides polyinsaturés n'entrent pas en ligne de compte pour la synthèse à partir de l'acétate. Les valeurs obtenues se rapportent donc surtout à la synthèse de l'acide oléique. La proportion de la radioactivité incorporée dans les acides non saturés était de 41% à la suite d'un régime sans graisse. Elle passe à 16,5% en présence d'acide palmitique ($p < 0,001$).

Composition des réserves et synthèse immédiate à partir d'acétate 1¹⁴
à la suite de divers régimes

Régimes	Acides non saturés			Acide palmitique			Acide stéarique	
	Taux en % des AGT	Activité retrouvée en % activité tot.		Taux en % des AGS	Activité retrouvée en % activité tot.		Taux en % des AGS	
Sans gras	Moyennes 73,6 Ecart standard 3,5 Probabilité $P<0,001$	Moyennes 41 Ecart standard 10,2 Probabilité $P<0,001$		Moyennes 69 Ecart standard 6,7 Probabilité $P<0,001$	Moyennes 47,8 Ecart standard 10,5 Probabilité $P<0,001$		Moyennes 26,2 Ecart standard 6,0 Probabilité $P<0,001$	
Palmitate seul	Moyennes 59,8 Ecart standard 3,8 Probabilité 0,50 ($P<0,05$)	Moyennes 16,5 Ecart standard 8,8 Probabilité $P=0,02$		Moyennes 77,5 Ecart standard 5,8 Probabilité 0,10 ($P<0,20$)	Moyennes 72,7 Ecart standard 6,9 Probabilité 0,01 ($P<0,02$)		Moyennes 17,5 Ecart standard 3,5 Probabilité 0,60 ($P<0,70$)	
Sans palmitate	Moyennes 69,8 Ecart standard 4,4 Probabilité $P<0,05$	Moyennes 31,4 Ecart standard 5,8 Probabilité $P<0,001$		Moyennes 65,5 Ecart standard 4,6 Probabilité $P<0,001$	Moyennes 62,8 Ecart standard 4,4 Probabilité 0,01 ($P<0,001$)		Moyennes 25 Ecart standard 3,30 Probabilité $P<0,001$	

AGS : acides gras saturés

AGT : acides gras totaux

Tableau 3

Pour discuter la signification de cette observation, il faut d'abord chercher à comprendre le sens de la synthèse très rapide d'acides non saturés que nous constatons dans nos expériences.

En effet, il est classique d'admettre que les acides gras monoéthéniques proviendraient de la désaturation des acides saturés correspondants. Or ce phénomène est un phénomène lent. En conséquence, il ne peut rendre compte du taux élevé de radioactivité que nous rencontrons dans nos acides non saturés qui proviennent de souris exécutées à des temps remarquablement courts après l'administration de l'acétate marqué.

Dé plus, si le facteur temps semble jouer un rôle de tout premier plan ici, l'importance du régime n'est pas à minimiser non plus. Tout comme pour l'acide palmitique la quantité d'acides gras préexistants dans les réserves n'intervient pas. L'état de besoin est donc à exclure. Mais la possibilité d'une compétition entre les acides palmitique et oléique n'est pas à négliger.

c) Etude en fonction du temps :

Ceci nous amène à examiner la rapidité d'incorporation en fonction du temps (cf. tableau 4). En 30 secondes déjà, il semble que la moitié environ de la synthèse soit effectuée. Les activités totales, indépendamment du régime, s'échelonnaient entre 1.390.000 et 2.895.000 c.p.m., pour les souris exécutées 30 se-

ACTIVITE TOTALE DANS LES A.G.T.

Régimes	N° des souris	Poids souris avant Régime	Poids souris Après Régime	Poids des A.G.T.	Activité spécifique	Activité totale en c.p. m.
Sans graisse	30 sec. 231	24	23	0.865	381	1.465.000
	232	24	23	1.084	300	1.440.000
	233	22	21	0.882	634	2.490.000
	236	22	21	1.086	468	2.240.000
	237	21	18	0.274	1.137	1.390.000
	238	23	22	0.880	610	2.400.000
	3 min. 113	30	27	0.890	4.875	4.330.000
	116	35	31	1.290	3.100	4.000.000
	119	32	28	0.825	4.600	3.800.000
	122	28	28	2.350	1.400	3.300.000
Palmitate seul	128	29	27	0.948	4.210	4.000.000
	30 sec. 239	23	20	0.403	837	1.540.000
	243	25	23	1.873	160	1.335.000
	244	23	22	0.881	497	1.950.000
	245	23	22	0.937	293	1.218.000
	246	22	21	1.259	322	1.795.000
	247	21	20	1.635	405	2.895.000
	3 min. 115	19	22	1.948	2.600	4.560.000
	118	31	28	1.746	1.478	2.220.000
	121	27	28	1.633	2.150	3.500.000
	124	34	28	0.836	2.050	1.600.000
	127	24	25	2.045	2.380	4.750.000
	130	25	26	1.445	3.700	3.450.000

A.G.T. = Acides gras totaux

Tableau 4

condes après l'injection, alors que les chiffres extrêmes, enregistrés pour les souris sacrifiées 3 minutes après l'administration d'acétate, étaient de 2.200.000 et 4.560.000.

Or, aucune différence notable n'était observée dans les activités totales après 3 et 12 minutes. Il allait de soi que les acides néoformés, fortement dilués par les acides préexistants ne pouvaient modifier la répartition des acides gras dans les graisses de réserve.

Mais des expériences en fonction du temps trouvaient leur justification dans la nécessité de déterminer les conditions favorisant une synthèse maximum dans un temps particulièrement court. Cette précocité était souhaitable pour surprendre les mécanismes immédiats de synthèse avant que des facteurs de régulation ne viennent se superposer et en masquer le développement. Ainsi un acide aurait pu être synthétisé plus intensément qu'un autre dans des temps très courts mais se transformer presque aussitôt en un autre acide et cet accroissement de synthèse serait ainsi passé inaperçu. Mais il n'en est rien. En effet, à 3 minutes par exemple, les pourcentages d'activité retrouvés dans l'acide palmitique varient entre 36 et 60% et l'on observe une dispersion semblable à 30 secondes, soit 37,9 et 64,2%. C'est pourquoi nous n'avons pas cru nécessaire, dans nos résultats antérieurs de présenter des tableaux en fonction du temps.

d) Influence du régime sur la synthèse globale :

Les variations des activités totales en fonction du régime ont également fait l'objet de notre étude (Cf. tableau 5).

L'accroissement de la synthèse se manifeste de façon globale dans tous les groupes carencés. Ne manque-t-il qu'un acide gras dans le mélange, l'animal se comporte comme dans un régime sans graisse, c'est-à-dire renferme un taux de graisse nettement supérieur aux souris normalement alimentées, dans les cas où les souris sont sacrifiées 1 minute après l'injection. Mais à 12 minutes, les souris normales rattrapent leurs congénères carencés dont le taux semble déjà avoir atteint son maximum à 1 minute. Des mécanismes régulateurs ont peut-être permis aux souris carencées de se débarrasser des acides nouvellement synthétisés qui sont, ont le sait plus facilement labiles. L'équilibre est sensiblement rétabli avec les souris normales, qui atteignent progressivement et lentement un certain seuil qui semble ne pouvoir être déplacé.

L'objet de l'expérience suivante nous a été dicté par les résultats obtenus in vivo.

Un point important restait à préciser. Devait-on admettre qu'un excès d'acide palmitique dans les graisses de réserve allait inciter l'organisme à accroître son déséquilibre?

Activité totale dans les acides gras totaux après injection i.v.
 de $32,10^6$ c.p.m. d'acétate $1-^{14}C$.

Régime	1 minute	3 minutes
Graisses normales	Moyennes 1.575.000 cpm Probabilités $0,02 < P < 0,05$	Moyennes 2.223.470 cpm Probabilités $0,02 < P < 0,05$
Sans graisse	Moyennes 2.240.000 cpm Probabilités $P = 0,10$	Moyennes 3.084.000 cpm Probabilités $0,02 < P < 0,05$
Sans palmitate Palmitate seul	Moyennes 2.040.000 cpm 2.320.000 cpm Probabilités $0,02 < P < 0,05$	Moyennes 3.263.500 cpm Probabilités $0,02 < P < 0,05$

Tableau 5

Le choix d'une expérience in vitro nous offrait un double avantage, non seulement nous pouvions vérifier directement l'expérience in vivo en incubant des tissus adipeux en présence d'acétate 1^{14}C , mais encore par l'intermédiaire d'un inhibiteur du mécanisme de condensation, rendre, dans l'affirmative, ce résultat presque indiscutable. En effet, en bloquant ce mécanisme, qui synthétise presque exclusivement l'acide palmitique, contrairement au mécanisme d'élongation qui a un domaine d'action plus étendu, toute ambiguïté doit être levée si une diminution de synthèse se produit. Elle confirmerait à la fois l'existence et l'origine non mitochondriale de l'anomalie constatée.

Synthèse in vitro

2° Partie expérimentale

a) Justification des conditions choisies :

- Choix du régime : L'acide palmitique ayant présenté les résultats les plus aberrants dans les expériences in vivo, c'est donc en fonction de cet acide que les régimes ont été institués.

- Choix de l'inhibiteur : Pour déterminer la participation respective des mécanismes de condensation et d'élongation à cet accroissement, la meilleure solution était de bloquer l'un d'entre eux. On savait que les enzymes du système non mitochondrial, par suite de leur groupement fonctionnel sulfhydryle, étaient

susceptibles d'être inhibés par des corps tels que l'iodoacétamide ou l'arsénite. Notre choix se porta vers l'iodoacétamide.

b) Déroulement de l'expérience :

Deux groupes de 4 souris mâles ont servi à cette expérience.

Régime :

Le premier groupe était alimenté pendant 3 semaines par un mélange :

acide palmitique	3%
tripalmitine	7%

en addition au régime dégraissé.

Un deuxième groupe avait reçu parallèlement, un régime dont les 10% de graisse renfermaient très peu d'acide palmitique. Pour cela, l'huile d'olive employée avait dû être purifiée comme suit : un litre était cristallisé par refroidissement d'une solution à 10% dans l'acétone (-18°). Les cristaux séparés, le filtrat était à nouveau cristallisé à -30° . Une nouvelle filtration était effectuée. L'huile ne renfermait plus que 4,5% d'acide palmitique pour 9% à l'origine.

11% de ce régime étaient constitué par :

huile d'olive	7
tristéarine	3
trilinéoléine	1

les 89% restant étant formés de régime sans graisse.

Milieu d'incubation

Préparation du milieu d'incubation :

Ce milieu renfermait :

- 11 ml d'une solution aqueuse d'albumine humaine renfermant 15% d'albumine et 3% de glucose.

- 22 ml de tampon

Composition du mélange tampon : (18)

ClNa 0,9% : 100

ClK 1,15% : 4

SO₄Mg, 7H₂O 3,8% : 1

Un mélange de 40 ml de PO₄HNa₂ 0,25 M et 2 ml ClH N.

Q.S.P. 100 ml et ajusté à pH 7,4 : 21

- 8 ml de solution d'acétate 1¹⁴C.

10 ml du milieu étaient répartis respectivement dans quatre béchers. Deux recevaient 0,1 ml d'une solution d'iodoacétamide M/100, concentration pour laquelle Lynen (19) avait décrit une inhibition totale du mécanisme de condensation.

Technique d'incubation :

Les souris à jeun depuis la veille au soir recevaient une heure avant leur exécution, un gramme de pain. Après décapitation, les graisses inguinales étaient prélevées et pour lever toute ambiguïté, réparties symétriquement dans deux erlenmeyers contenant, l'un, le milieu additionné d'iodoacétamide, l'autre,

tre, le milieu seul. Les erlenmeyers étaient maintenus dans un bain-marie à 37° pendant 5 H 3/4, avec agitation intermittente. Le temps d'incubation écoulé, une filtration permettait de séparer le tissu adipeux du milieu, trois rinçages étaient entreprise au moyen de la substance tampon. Une saponification était alors effectuée et on extrayait les acides gras qui étaient ultérieurement chromatographiés sur colonne.

3° Résultats et discussion

a) Synthèse des acides gras in vitro, ou l'absence d'inhibiteur :

Les activités spécifiques ont particulièrement retenu notre attention.

Même dans le groupe enrichi en acide palmitique, la synthèse s'effectue préférentiellement au profit de l'acide palmitique. Ce résultat est absolument comparable à celui obtenu in vivo et le confirme.

b) Synthèse des acides gras in vitro, en présence d'un inhibiteur :

Une baisse spectaculaire de l'activité des acides gras totaux est enregistrée. Cette baisse était facilement prévisible, l'iodoacétamide exerçant son action inhibitrice sur le mécanisme de condensation dont l'unique produit est l'acide palmitique et qui constitue à lui seul, 75% environ des acides saturés.

Mais fait particulièrement intéressant, la même

activité spécifique est retrouvée pour les acides palmitique, stéarique et non saturés.

C'est donc bien le système non mitochondrial qui est responsable de l'accroissement de la synthèse de l'acide palmitique dans un organisme qui en avait déjà trop.

Si l'acide palmitique peut être synthétisé à la fois par les deux systèmes, comme l'ont démontré de nombreux essais in vitro, l'acide oléique, lui, n'apparaît pas en proportion notable dans les systèmes artificiels étudiés jusqu'à ce jour.

On pouvait donc supposer soit qu'il existait in vivo un troisième mécanisme permettant la formation de l'acide oléique, soit que l'un des deux systèmes précités ne pouvait plus élaborer d'acide oléique dans les préparations de tissus isolés. De prime abord, il est assez vraisemblable que l'acide oléique est le principal produit du système mitochondrial puisque, in vivo, ce système forme un excès d'acide stéarique. Nos résultats, obtenus en présence d'iodoacétamide, semblent confirmer cette hypothèse. Le système non mitochondrial ^{et} exercerait une inhibition sur le système mitochondrial/synthétiserait principalement et même in vitro dans ce cas, des acides non saturés. En effet, on se rappelle que les activités spécifiques enregistrées pour les différents acides étaient identiques. Or, le taux des acides non saturés dans les réserves est de beaucoup le plus élevé.

Une compétition existerait donc entre les deux systèmes. Au début de la synthèse, l'équilibre serait d'abord déplacé au profit du système mitochondrial. Secondairement le système non mitochondrial serait favorisé. In vitro, pour des raisons inconnues, l'inhibition portant sur le système mitochondrial serait plus précoce ou plus intense.

*
* *

MOBILISATION ET DEPART DES ACIDES GRAS DU TISSU ADIPEUX

1° Introduction

Etant donné que la dégradation des acides gras ne s'accomplit pas pour une part importante au lieu même où ils sont en réserve, il importe d'examiner si la mobilisation des différents acides gras s'effectue dans des conditions semblables lorsque l'animal doit rétablir une composition normale pour les acides gras de son tissu adipeux, et lorsque ses réserves sont régulièrement constituées.

On peut envisager deux possibilités en rapport avec cette mobilisation. On pourrait admettre premièrement que tous les acides gras de réserve quittent le tissu adipeux dans la proportion même où ils y existent et que ce n'est qu'au niveau des combustions dans d'autres tissus comme le foie, que se ferait la sélection. Il se pourrait d'autre part que les acides en excès soient plus facilement mobilisés que les autres. Quelques études comparatives ont été faites à ce propos. Gold et des collaborateurs (20), ainsi que Meinertz (21) ont montré qu'il y a plus d'acide oléique dans les glycérides de dépôt que dans les acides gras libérés dans le milieu d'incubation.

Les expériences de ce type ont généralement été réalisées in vitro et c'est également, à des incubations de graisses épидидymales de souris dans un milieu approprié, que nous nous sommes adressé.

2° Partie expérimentale

a) Justification des conditions de l'expérience

Principe :

Si pendant longtemps, le tissu adipeux a été considéré comme un organe de stockage, cette conception est de plus en plus abandonnée. Une activité métabolique importante lui est actuellement reconnue. En particulier les acides gras, libérés par l'hydrolyse des lipides, vont migrer des tissus de réserve vers les organes d'utilisation.

Cette opération ne peut se produire qu'à partir de tissu adipeux mis à incuber alors que n'importe quel autre tissu placé dans les mêmes conditions ne libère aucun acide gras.

L'enrichissement d'un organisme en un acide quelconque, devait nous permettre de voir par comparaison de la répartition des graisses dans le tissu adipeux et son milieu d'incubation, si le tissu procédait, au moins indirectement, au rétablissement d'une répartition normale dans ses graisses. Il pouvait, par exemple, libérer préférentiellement l'acide gras excédentaire pour favoriser sa combustion.

Rôle de l'albumine:

Les lipides libres, estérifiés ou non, n'existent

pas car ils sont complexés sous forme de complexes lipidoprotidiques.

Les acides gras estérifiés sous forme de glycérides, phospholipides ou stérides se cénapsent sur les globulines alors que les acides gras libres, qui nous intéressent ici, se cénapsent seulement sur des sérums-albumines.

La présence d'albumine dans le milieu d'incubation avait donc non seulement pour objet de nous rapprocher des conditions physiologiques mais encore de permettre une mobilisation beaucoup plus efficace des acides gras.

b) Déroulement de l'expérience

Régime :

Deux régimes étaient institués. Certaines souris recevaient comme source de lipides uniquement de l'acide palmitique.

- Groupe 1 :

- acide palmitique _____ 3 parties
- tripalmitine _____ 7 parties

- D'autres étaient carencées en cet acide groupe 2:

- huile d'olive purifiée-4 parties
- acide oléique purifié__3 parties
- tristéarine _____3 parties
- trilinoléine _____1 partie

Deux expériences successives, la première comprenant 7 souris dans chaque groupe, la deuxième 4, ont été réalisées.

Milieu et technique d'incubation

Le milieu d'incubation utilisé était identique à celui décrit dans les expériences de synthèse in vitro, abstraction faite de l'iodoacétamide que nous n'avons pas employé ici. La technique employée était également semblable.

3° Résultats et discussion

Le tableau des résultats (cf. tableau n° 6) donne la proportion de chacun des acides gras dans les graisses épидидymales et dans le milieu correspondant pour deux séries d'animaux différents.

Les animaux ayant reçu uniquement de l'acide palmitique dans leur régime présentent comme on pouvait s'y attendre un taux d'acide palmitique et palmitoléique dans leurs graisses constitutives plus fort que ceux qui ont reçu un régime sans acide palmitique. Mais ces derniers contiennent davantage d'acides oléique et linoléique (figure 3).

Ces résultats s'interprètent le plus facilement en considérant les rapports des proportions des graisses constitutives aux graisses du milieu. On voit comme dans les expériences citées ci-dessus que l'acide oléique est retenu dans les graisses constitutives chez les souris qui n'ont pas reçu d'acide palmitique dans leur régime. Au contraire, une proportion importante d'acide oléique est libérée dans le milieu chez les animaux nourris à l'acide

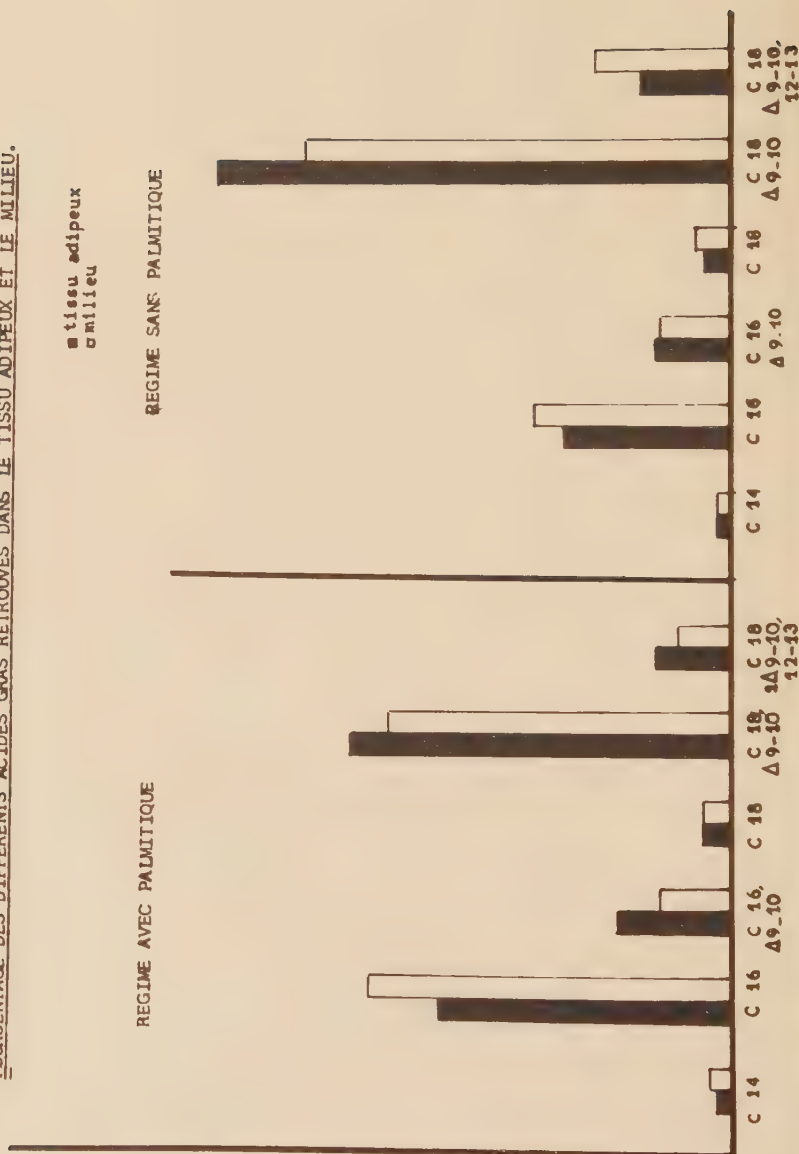
MOBILISATION ET DEPART DE GRAISSES DU TISSUS ADIPEUX

GROUPES	Graisses constitutives inguinales						Graisses retrouvées dans le milieu						§ non saturés		Rapport des graisses constitutives aux graisses du milieu					
	Myristique en %	Palmitique en %	Palmito-oléique en %	Stéarique en %	Oléique en %	Linoléique en %	Myristique en %	Palmitique en %	Palmito-oléique en %	Stéarique en %	Oléique en %	Linoléique en %	dans les réserves	dans le milieu	Myristique	Palmitique	Palmito-oléique	Stéarique	Oléique	Linoléique
I Palmitique	1,72	30,42	12,92	3,12	43,5	8,4	2,6	41,5	7,8	2,9	39,3	5,9	64,82	53	0,85	0,86	1,45	0,89	0,94	1,23
II Pas de Palmitique	1,2	18,8	8,5	2,6	58,7	10,2	1,2	22,3	8,3	4	48,4	15,8	77,42	72,53	1,00	0,82	1,02	0,65	1,20	0,64

tableau 6

Figure III.

POURCENTAGE DES DIFFERENTS ACIDES GRAS RETROUVES DANS LE TISSU ADIPEUX ET LE MILIEU.



palmitique. C'est l'acide palmitoléique qui est le moins facilement mobilisé. Mais, on n'observe pas de différence notable dans les proportions d'acide palmitique trouvées dans le milieu par rapport aux graisses constitutives. Il paraît donc évident que l'abondance d'acide palmitique trouvé dans le tissu adipeux ne favorise pas sa mobilisation, et que si l'adaptation fait intervenir avant tout la combustion des acides gras excédentaires, ces derniers parviennent au siège de la dégradation accompagnés d'une proportion normale des autres acides gras.

*
* *

C A T A B O L I S M E

1° Introduction

Si, d'après les conceptions récentes, le foie a quelque peu perdu de son importance comme agent actif de la lipogenèse, il la conserve à l'égard du catabolisme des lipides. Au moins 50% des acides gras sont dégradés dans le foie, et ce chiffre élevé est probablement en relation directe avec la richesse en mitochondries de cet organe. Le coeur et le rein ont également une activité enzymatique élevée.

Les enzymes qui interviennent dans ces oxydations ne peuvent exercer leur action que sur des acides gras libres. Le taux d'oxydation des acides gras à longue chaîne sera donc en régression chaque fois que l'utilisation du glucose sera favorisée les acides gras se fixant alors sur les radicaux α -glycérophosphates en excès pour former des triglycérides (22).

Les enzymes responsables des différentes étapes de la dégradation ont été isolés à l'état pur (23). Ce sont, par ordre d'entrée en action :

- Une thiokinase catalysant la transformation de l'acide en dérivé acyl-CoA.

- Une déshydrogénase ($\text{FAD} \longrightarrow \text{FADH}_2$) introduisant une double liaison en β .

- Une enoylhydrase fixant une molécule d'eau sur la double liaison précédemment introduite.

- Une β -hydroxyacyldéshydrogénase, nouvelle déshydrogénation réalisée par DPN^+ .

On obtient un acide β cétonique. La perte d'un acétyl-CoA par action d'une β cétoacylthiolase nous conduira, en catalysant la fixation d'un deuxième CoASH, à un dérivé acyl-CoA à deux atomes de carbone de moins, qui pourra subir à son tour un nouveau raccourcissement. La thiokinase n'est alors plus utile puisque l'acide est déjà actif.

L'acétyl-CoA rejoint l'oxaloacétate provenant du métabolisme glucidique et se combine avec celui-ci sous forme d'acide citrique pour entrer dans le cycle tricarboxylique où il sera éliminé sous forme d'anhydride carbonique et eau.

Les taux d'oxydation des acides gras marqués ont fait l'objet de nombreuses études in vitro. Les résultats indiquent l'existence d'un pool à activité métabolique particulièrement intense pour les acides gras dernièrement administrés et distinct de celui des acides gras déjà en réserve (24).

Nous ne sommes intéressés ici naturellement que par les acides gras à longue chaîne qui seuls, entrent dans la constitution des glycérides, les autres étant

oxydés avant que cette étape puisse se produire (25). Notre but était de voir si le catabolisme des acides gras était influencé par la composition des graisses constitutives de l'animal, ou autrement dit, si ce mécanisme s'effectuait toujours avec la même intensité quel que soit l'état de richesse ou d'appauvrissement en un acide.

Nous nous bornerons à ces quelques remarques générales concernant le mécanisme de dégradation des acides gras. En effet, d'autres aspects de ce problème, comme par exemple la formation des corps cétoniques et les relations avec le métabolisme glucidique et protidique n'ont rien à voir avec le sujet étudié.

2° Partie expérimentale

a) Principe et justification des conditions d'expériences

Principe :

L'expérience est basée sur les constatations suivantes : un organisme tendant à dégrader préférentiellement les acides gras dernièrement introduits ou produits, si on administre à un animal, dans le régime, un acide gras marqué, il l'utilisera assez rapidement et en éliminera du gaz carbonique. En recueillant le CO_2 provenant de la respiration et en mesurant sa radioactivité en fonction du temps, on peut déterminer avec assez de précision la quantité totale de substance radioactive éliminée par 24 heures. Cette

l'expérience menée comparativement sur deux animaux, l'un enrichi, l'autre appauvri en un certain acide gras permet de juger de l'influence du régime, ou plus exactement de la répartition des graisses dans les réserves, sur la combustion de ces acides.

- Utilisation de souris à jeun :

L'oxydation des acides gras à longue chaîne (mais non des courts) est considérablement accrue quand l'organisme est à jeun, comme en témoignent de nombreuses expériences effectuées in vivo et in vitro. En effet, il est vraisemblable que la formation d'glycérophosphate, plus considérable lors d'une alimentation normale, gêne l'utilisation des acides gras, vraisemblablement, en favorisant la synthèse des tri-glycérides.

- Durée des expériences :

Nous avons mesuré dans nos premières expériences, la radioactivité retrouvée dans les carbonates, 5 h et 8 h après l'introduction des souris dans les cages. Cette radioactivité croissait dans l'intervalle. C'est pourquoi nous avons cru bon, pour plus de sécurité de prolonger les prélèvements jusqu'à 13 et même 24 heures, quoiqu'à 13 heures déjà nous estimions que la dégradation pouvait être considérée comme terminée.

b) Déroulement de l'expérience :

Régime :

Des souris, 4 femelles et 1 mâle, reçoivent pendant quatre semaines un régime, soit exclusivement consti-

tué par de l'acide palmitique :

- acide palmitique 3 parties
- tripalmitine 7 parties,

soit pratiquement dépourvu d'acide palmitique :

- huile d'olive purifiée 4 parties
- acide oléique purifié 3 parties
- tristéarine 3 parties
- trilinoléine 1 partie

Parallèlement, deux groupes de souris, quatre mâles, une femelle suivent un régime exclusivement constitué par de l'acide stéarique :

- - acide stéarique 3 parties
- tristéarine 7 parties

soit pratiquement dépourvu d'acide stérique :

- huile d'olive naturelle 7 parties
- acide palmitique 3 parties
- trilinoléine 1 partie

Marquage des lipides :

Les souris sont mises à jeûner la veille de l'expérience. Le lendemain matin, on leur administre, sous forme marquée, dans leur dernier repas, l'acide dont elles ont reçu un excès dans le régime ou dont au contraire, elles ont été privées.

Mesures respiratoires :

Un quart d'heure après la fin de l'ingestion, les souris sont introduites dans des cages métaboliques de verre portant des tubulures latérales pour l'ali-

mentation en eau, le contrôle de la température et un dispositif pour recueillir les déjections de l'animal.

La cage contenant la souris est reliée, d'un côté, à une série de deux éprouvettes de 500 ml renfermant une solution à 3% de potasse destinée à capter le CO_2 dégagé par la respiration de la souris et à une trompe à vide.

De l'autre côté, la cage est en relation par l'intermédiaire d'un piège à CO_2 avec un débitmètre à flotteur qui permet l'établissement, dans l'ensemble du dispositif, d'un régime de pression constant.

Des prélèvements de 20 ml sont effectués dans la première éprouvette, successivement, 1 h, 2 h, 5 h, 8 h, et 13 heures après l'introduction des animaux. Le dernier prélèvement a lieu 24 heures après et est réalisé simultanément dans les deux cylindres. Les différents échantillons contenant le CO_2 marqué et non marqué sous forme de CO_3K_2 , sont chauffés au bain-marie par addition de chlorure de baryum, les carbonates précipitent sous forme de CO_3Ba . Après refroidissement et filtration sur creusets de Gooch tarés, le précipité séché est pesé. Le poids des carbonates est ainsi déterminé après déduction du témoin (quantité de carbonate de baryum provenant de la précipitation de 20 ml de la solution diluée de KOH).

Une quantité connue de ces carbonates, 15 mg environ, est prélevée et déposée dans des cupules où

ils sont fixés par évaporation d'une solution alcoolique de "ciment Ducco" (40 g de ciment pour 0,3 ml d'alcool). Leur activité est ensuite comptée et rapportée au poids total de carbonates aux divers temps.

Mode de calcul :

La valeur de la radioactivité recueillie dans la deuxième éprouvette est estimée approximativement de la manière suivante : les activités totales contenues dans les deux éprouvettes, pour 24 heures de respiration, sont additionnées. Le rapport de ce résultat, à la radioactivité contenue dans la première éprouvette pour le même temps, nous indique le facteur correctif qui doit nous permettre de rectifier les divers résultats obtenus pour la première éprouvette.

Le bilan est complété par calcul de la radioactivité non absorbée (retrouvée dans l'intestin) et non ingérée (dans les reliquats de régime).

Le calcul des activités spécifiques ne diffère en rien de celui des acides gras, si ce n'est pas l'usage d'une courbe de self-absorption propre aux carbonates. Le choix d'une prise d'essai de l'ordre de 10 à 20 milligrammes, diminue les causes d'erreur.

3° Résultats et discussion :

(Cf. tableau n° 8). Les souris qui reçoivent de l'acide stéarique ou de l'acide palmitique marqué dans

INTERCONVERSIONS

Régimes	N°	Activité spécifique						% act. Act. Totale							
		P	S	OH	P/S	P/OH	S/OH	S/P	P	S	OH	P/S	P/OH	S/OH	S/P
I Sans Palmitique	16	2500	1820	650	1.38	3.8	2.8	0.73	44.2	22.6	33.4	1.9	1.3		
	14	330	217	92	1.52	3.6	2.35	0.66	35.1	11.6	54.3	3.3	0.65		
II Palmitique	15	1850	585	700	3.15	2.63	0.83	0.32	80.2	8.7	11.1	9.2	7.3		
	13	532	73	150	7.3	3.58	0.49	0.14	54.6	3.1	42.3	17.6	1.3		
III Sans Stéarique	22	1450	36000	3000	0.041	0.48	12.0	25	9	56.2	34.8			1.6	6.3
	4	127	1680	136	0.076	0.93	12.38	13.2	9.2	48.8	42			1.2	5.3
IV Stéarique	21	2520	18000	2000	0.14	1.26	9	7.1	9.8	61.4	28.8			2.1	8.3
	23	448	5000	77	0.089	5.8	66	11.2	12.2	77.6	10.2			7.6	6.3
	3	215	2500	194	0.086	1.11	12.00	11.6	10.7	54.8	34.5			1.6	5.1

OH = hydroxylés
P = palmitique
S = stéarique

Tableau 7

Pourcentage des activités retrouvées dans les différents acides et de leurs activités spécifiques chez des souris ayant reçu dans leur dernier repas de l'acide palmitique ^{14}C (fr. I et II) ou de l'acide stéarique (fr. III et IV).

leur dernier repas, le dégradent plus rapidement si leur régime préalable contenait un excès de cet acide que si il en était dépourvu. Les moyennes des résultats s'inscrivent sur des courbes de morphologie comparable et leurs différences sont significatives. (Voir figure n° 4 et 5). Dans deux cas toutefois des résultats aberrants sont constatés.

Ainsi pour l'acide palmitique, une des souris carencées en cet acide a dégradé au départ une quantité plus forte de l'acide radioactif administré à un dernier repas que la souris correspondante qui en avait reçu un excès pendant les trois semaines précédentes. Cette anomalie a été supprimée dès la deuxième mesure, cinq heures après le repas, et la combustion de l'acide palmitique marqué est devenu plus forte dès la troisième mesure (8 heures).

Pour une des souris ayant reçu de l'acide stéarique en excès nous avons fait une constatation semblable, mais dans ce cas, l'anomalie s'est poursuivie pendant les huit heures de l'expérience. La raison en a été cette fois particulièrement claire : cette souris n'a cessé de dormir pendant toute l'expérience alors que sa congénère traitée parallèlement, était particulièrement excitée.

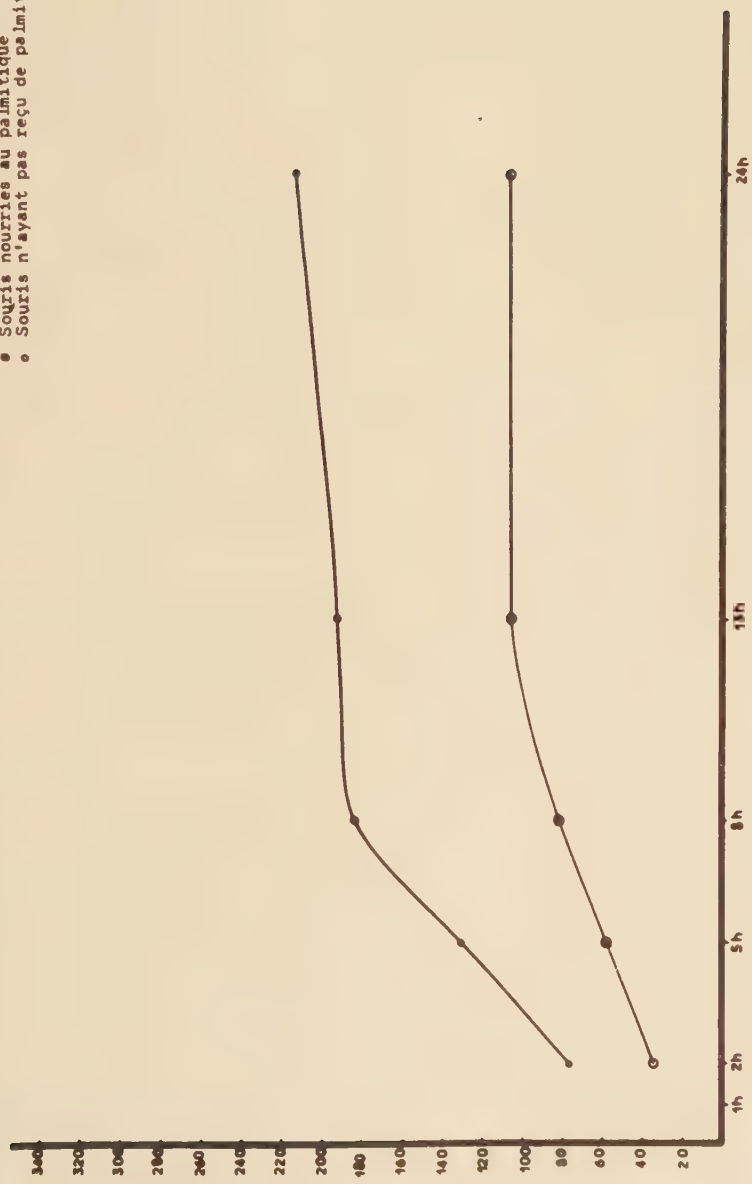
Les résultats de cette série d'essais peuvent donc être considérés comme tout à fait cohérents et nous permettent de conclure que l'organisme de la souris se débarrasse surtout de ces acides gras excédentaires en accélérant leur dégradation.

*

C.P.M.
1000

Figure IV

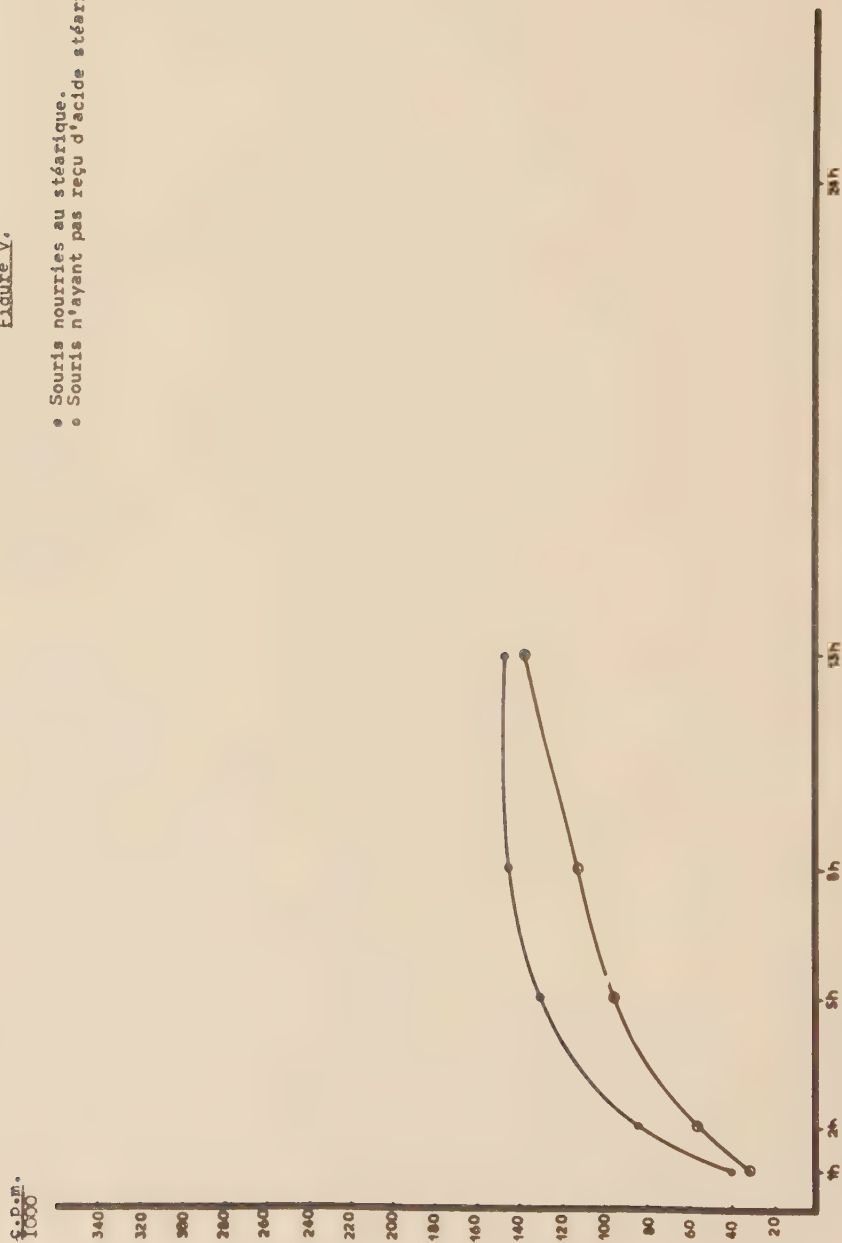
- Souris nourries au palmitique
- Souris n'ayant pas reçu de palmitique



Courbes moyennes des activités en c.p.m. retrouvées dans les carbonates en fonction du temps, après combustion d'acide palmitique marqué administré dans le dernier repas chez des souris carencées ou au contraire enrichies en cet acide.

Figure V.

- Souris nourries au stéarique.
- Souris n'ayant pas reçu d'acide stéarique.



Courbes moyennes des activités en C.P.M. retrouvées dans les carbonates en fonction du temps, après combustion d'acide stéarique marqué administré dans le dernier repas chez des souris carencées ou au contraire enrichies en C et acide.

INTERCONVERSIONS

1° Introduction

Nous bornerons notre étude aux interconversions entre les différents acides saturés et non saturés monoéthéniques qui représentent les constituants les plus abondants des graisses de souris.

a.) Interconversions entre acides saturés :

Deux possibilités de transformation du stéarique en palmitique ont été démontrées. En effet, par perte d'une molécule d'acétyl-CoA, l'acide stéarique aboutit à la formation d'un élément en C 16. Mais ceci ne constitue qu'une voie très accessoire de transformation du stéarique en palmitique. La dégradation totale de l'acide stéarique en éléments en C2 et leur recondensation en acide palmitique serait plus productive.

Inversement, l'acide palmitique peut donner naissance à l'acide stéarique, comme en témoignent les classiques expériences utilisant le mécanisme d'élongation. C'est même la principale voie de formation de l'acide stéarique (26). Similairement, le passage du myristique au palmitique est également possible (27).

b) Conversions des acides saturés ou non saturés :

La passage des acides saturés aux acides non saturés correspondants est connu depuis fort longtemps. Ce serait même pour certains auteurs, comme nous l'avons vu dans l'exposé sur la synthèse, le seul moyen de formation des acides non saturés (18). Les acides palmitoléique et oléique proviendraient respectivement des acides palmitique et stéarique.

c) Conversions des acides non saturés ou acides saturés :

Les acides gras non saturés peuvent à leur tour, être dégradés en groupement acétiques, qui par recondensation pourraient être à l'origine indifféremment du palmitique et du stéarique, alors que la saturation de ces acides en acides saturés correspondants semble peu probable (28).

Mais toutes les expériences dont nous rapportons l'interprétation ci-dessus, avaient principalement pour objet d'étudier les possibilités de transformation d'un acide en un autre. Pour nous, le problème était différent. Il s'agissait de préciser les conditions de mise en marche et les limites de possibilités des phénomènes d'interconversions à des fins de régulation. Il paraissait possible qu'un organisme saturé en acide palmitique le transforme préférentiellement en acide stéarique. Inversement, cette transformation devait être ralentie en cas de pénurie en cet acide.

2° Partie expérimentale

a) Justification des conditions d'expérience

Principe : Des modifications sont introduites dans la répartition des graisses de réserve par un enrichissement ou un appauvrissement en un acide donné. Pour compenser ces perturbations, l'organisme peut éventuellement avoir recours à des phénomènes d'interconversions. Les principales transformations possibles devant être : pour l'acide palmitique, transformation en acide stéarique, ce dernier se désaturant vraisemblablement en acideoléique. Il semble paradoxal d'envisager la possibilité de cette dernière réaction, quand nous avons, tout au long du chapitre sur la synthèse, essayé avec insistance de démontrer son incapacité à assurer la synthèse des acides non saturés, et à attribuer à ceux-ci un mécanisme de synthèse différent, si ce n'est spécifique. Cette contradiction n'est qu'apparente car ces deux voies de synthèse peuvent très bien coexister. Ce que nous rejetons dans les pages précédentes ce n'était pas la possibilité d'une désaturation de l'acide stéarique, mais son intervention à un moment où elle ne pouvait avoir eu le temps de se produire. Celle-ci ne peut être que tardive et serait peut-être même réservée à des fins de régulation.

Régime : Les animaux ayant servi à ces expériences étant les mêmes que ceux utilisés pour les combustions, nous renvoyons à ce chapitre pour la composition des régimes.

Technique : Les techniques d'étude des mécanismes d'interconversion sont également analogues aux techniques employées dans les essais destinés à voir le rôle de la synthèse in vivo, nous n'y reviendrons donc pas.

b) Déroulement de l'expérience :

Des souris étaient enrichies ou au contraire carencées en un acide déterminé afin de modifier la répartition de leurs graisses constitutives. Vingt quatre heures avant leur exécution, elles recevaient l'acide, dont elles avaient été privées ou au contraire comblées pendant leur régime, sous forme marquée. Pendant le laps de temps qui s'écoule entre ce repas et le moment de l'exécution (temps pendant lequel des mesures de CO_2 étaient effectuées), les acides gras subiront des phénomènes d'interconversions.

3° Résultats et discussion

Les résultats peuvent être trouvés sur le tableau n° 7 dans lequel nous avons inscrit les activités spécifiques et les rapports entre ces dernières. Pour juger facilement de la transformation d'un acide gras dans un autre, les proportions de l'activité totale retrouvée dans chaque acide gras ont été également rapportées.

Si un animal qui reçoit un excès d'acide palmitique, le fait disparaître en le transformant en un autre acide, une voie devrait être privilégiée, c'est

Groupes	N° des souris	Poids des carbonates										Activité totale retrouvée dans les carbonates			
		1 H	2 H	5 H	8 H	13 H	24 H	20.	1 H	2 H	5 H	8 H	13 H	24 H	
I Stéarique	2	33.6	53.2	155.5	245.5			57.4	29.500	57.200	132.000	172.000			
	3	48.6	85.3	193.3	277.9			13	34.000	72.500	128.000	173.000			
	5	33.4	61.3	101.7	129.9			86	61.000	108.000	144.000	146.000			
	21		58.6	115	182.5	372.3		16.8		92.500	115.000	127.500	130.000		
II Pas de stéarique	1	38.5	78.7	210.5	294.2			36.1	35.000	85.000	145.000	177.000			
	4	22.2	37.7	107.2	186.5			20.7	24.800	37.500	70.000	90.000			
	6	30.6	59.1	131.5	194.2			24.3	28.200	71.000	107.000	126.000			
	22	50.3	92.7	143.6	266			13		33.000	60.000	73.500	140.000		
III Palmitique	11		58	108.8	181.8	505.5	812.2	200.7		94.000	158.000	208.800	218.000	313.60	
	13		76.5	124.1	191.7	634.9	860.9	98		94.620	143.640	171.000	174.724	172.74	
	15		49	113.3	198	535	894	157		81.534	140.910	175.600	184.800	187.44	
	25		62.3	127.4	225.7	530	1100	17		41.000	80.000	188.000	196.000	196.00	
IV Pas de palmitique	14		50.5	100.1	169	357.3	799.8	66.2		23.776	44.776	78.848	78.848	124.60	
	16		46	135.9	216	405	899	61		30.098	53.752	81.400	109.220	109.22	
	20		85.4	207.1	329.1	558.2	800	321.3		28.000	47.600	50.000	52.000	52.00	
	26		75.1	162	251	580	1000	300		60.400	83.000	120.000	150.000	154.00	

Tableau 8

Poids et activité retrouvés dans les carbonates provenant de la combustion
d'acides stéarique (gr. I et 2) et palmitique (gr. III et IV) ¹⁴C dans leur
dernier repas.

celle de l'élongation de l'acide palmitique en acide stéarique. C'est pour cette raison qu'il faut considérer avec une attention toute particulière, le rapport des activités spécifiques de ces acides. Chez les animaux qui ont reçu pendant trois semaines un régime dépourvu d'acide palmitique, puis une seule administration d'acide palmitique marqué, on constate que la radioactivité est **3,3** fois plus faible dans le stéarique que dans le palmitique. Cette différence s'accroît énormément chez les animaux qui ont reçu un régime contenant uniquement de l'acide palmitique. La transformation est donc ralentie plutôt qu'accélérée chez ces derniers. Ce n'est donc visiblement pas par un mécanisme d'interconversion que l'organisme se débarrasse de l'excès d'acide palmitique.

L'acide stéarique est parmi les acides gras courants, le moins facilement toléré par l'organisme. On sait également que son coefficient d'absorption est le plus faible. De même nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la lipogénèse par le système mitochondrial est surtout destinée à former de l'acide oléique alors que l'acide stéarique s'inscrirait seulement en dérivation de la synthèse de ce dernier (29).

Nos expériences, comme celles de Schoenheimer et de Rittenberg (30), démontrent, chez toutes les souris qui ont reçu dans leur dernier repas de l'acide stéarique radioactif, une transformation très notable de cet acide en acides non saturés, qui, bien entendu,

sont surtout constitués par de l'acide oléique.

Cependant, comme dans le cas précédent, les souris qui ont été surchargées en acide stéarique n'en transforment pas une proportion plus grande, bien au contraire. Une certaine activité se retrouve dans l'acide palmitique et cette activité doit résulter d'une dégradation complète de l'acide stéarique, suivie d'une recondensation d'éléments en C2 puisque l'acide stéarique était marqué à son carboxyle. D'autre part, aucune différence ne s'observe entre les animaux nourris avec de l'acide stéarique et ceux qui n'en ont pas reçu. La conclusion qui peut être tirée de cette série d'essais est que la transformation d'un acide gras en un autre n'est pas un moyen de régulation important.

*
* *

C O N C L U S I O N

L'organisme ne semble pas posséder d'autres moyens que la dégradation, pour effectuer dans ses réserves, la régularisation de la répartition des ses acides gras.

Nous donnons les conclusions obtenues de l'étude des divers mécanismes supposés aptes à cette régulation.

1° Synthèse :

Une expérience a été effectuée afin de déterminer l'influence du régime sur la synthèse globale des acides gras, une minute et trois minutes après l'administration i.v. d'acétate 1^{14}C .

Une minute après, les moyennes de 1.575.000, 2.240.000 et 2.320.000 c.p.m. étaient obtenues respectivement, à la suite de régimes normalement constitués en graisses, sans graisse, sans palmitate ou ne renfermant que du palmitate. A 3 minutes, les chiffres enregistrés pour les trois premiers groupes étaient : 2.223.000, 3.084.000 et 3.263.000.

Quelle que soit la modification introduite par un régime dans les graisses constitutives, qu'il y manque un ou tous les acides, l'organisme semble réagir par un accroissement global de la synthèse.

Pour une plus ample connaissance de l'influence du régime sur la synthèse, nous avons examiné la répartition des différents acides néoformés à la suite des mêmes régimes. Les résultats étaient les suivants : les taux de radioactivité exprimés en pour cent de la radioactivité totale, retrouvés pour les acides palmitique et non saturés étaient respectivement : pour les souris nourries au régime sans graisse, 47,8% et 41%, pour celles recevant comme graisse uniquement du palmitate, 72,7% et 16,5%, et pour le groupe ne recevant pas de palmitate, 62,8% et 31,4%.

Compte tenu des modifications introduites dans la composition des graisses de réserve par suite du régime nous en rappelons les résultats : - taux d'acide palmitique exprimé en pour cent des acides saturés : pour les régimes sans graisse, palmitate seul et sans palmitate, 69%, 77,5% et 65,5%.

- Taux d'acide stéarique dans les mêmes conditions alimentaires, 26,2%, 17,5% et 25%.

- Taux d'acides non saturés par rapport aux acides gras totaux, toujours dans le même ordre : 73,6%, 59,8% et 69,8%, les conclusions suivantes peuvent être envisagées :

Un organisme enrichi en acide palmitique tendra à accroître son stock en cet acide. Le système non mitochondrial serait responsable de cette réponse aberrante, qui témoignerait de l'existence d'une compétition entre le système mitochondrial et le non mitochondrial.

En effet, appliquée à leurs principaux produits de synthèse, cette affirmation peut se traduire par l'existence d'une compétition entre l'acide oléique et l'acide palmitique, et serait en accord avec nos résultats. L'acide oléique ne serait pas synthétisé principalement par désaturation de l'acide stéarique, mécanisme trop lent, alors que la possibilité de formation de l'acide stéarique à partir de l'acide oléique ne serait pas à exclure.

Pour expliquer l'abondance de synthèse constatée pour les acides non saturés à des temps très courts, une troisième hypothèse peut être émise, comme celle de l'existence, au moins in vivo, d'un mécanisme propre à la synthèse des acides non saturés.

Toutes ces expériences exécutées in vivo, ont été effectuées parallèlement in vivo, excepté celle ayant trait à la synthèse globale. Les résultats paraissent concordants. Nous obtenions également un accroissement de la synthèse de l'acide palmitique dans un tissu déjà enrichi en cet acide sous l'action d'un inhibiteur du mécanisme de condensation (iodoacétamide) et une égalisation des activités spécifiques des diffé-

rents acides était notée. On peut la considérer comme consécutive à la suspension de l'inhibition exercée par le système non mitochondrial sur le système mitochondrial.

2° Mobilisation des acides gras du tissu adipeux :

Pour cette étude nous avons mis à incuber des graisses inguinales de souris diversement alimentées.

a) Les graisses de souris carencées en acide palmitique :

- retiennent l'acide oléique dans leurs graisses constitutives (58,7% pour 48,4%),

- libèrent dans le milieu la même quantité d'acide palmitique que celle contenue dans leurs réserves.

b) les graisses de souris enrichies en acide palmitique :

- libèrent dans le milieu plus d'acide oléique par rapport à la quantité présente dans leurs réserves que le groupe précédent (43,5% pour 39,3%),

- libèrent dans le milieu la même quantité d'acide palmitique que celle contenue dans leurs réserves.

c) C'est l'acide palmitoléique qui est le moins facilement mobilisé en particulier dans le groupe nourri avec du palmitique où l'on observe les taux de 12,9% dans les réserves pour 7,8% dans le milieu.

3° Catabolisme :

L'administration d'un acide marqué dans le der-

nier repas des souris, devait nous permettre de voir au moyen de mesures respiratoires si cet acide était dégradé de la même façon, indépendamment de sa richesse dans les réserves. Il en résulte que :

a) Un enrichissement des graisses constitutives en acide palmitique, par un régime approprié, accélère sa dégradation. Inversement, un appauvrissement la ralentit.

b) Un enrichissement des graisses constitutives en acide stéarique, par un régime approprié, accélère sa dégradation. Inversement, un appauvrissement la ralentit.

4° Interconversions :

L'acide gras marqué reçu pour la réalisation de l'expérience précédente, ne subit pas exclusivement des réactions de catabolisme.

Les phénomènes d'interconversions ont été étudiés 24 heures après l'administration de cet acide.

a) Un animal appauvri en acide palmitique l'allonge plus facilement en acide stéarique qu'un animal qui en possède une réserve abondante. En effet, les rapports des activités spécifiques (P/S) sont respectivement : groupe sans palmitique 1,38 et 1,52, groupe avec palmitique 3,15 et 7,3.

b) Une petite quantité de l'acide stéarique marqué administré aux souris carencées ou enrichies en cet acide, est dégradée en éléments en C_2 qui se recomb-

ment pour former de l'acide palmitique. Une certaine radioactivité est effectivement retrouvée dans l'acide palmitique alors que l'acide stéarique est administré sous forme d'acide 1^{14}C , les rapports des activités spécifiques S/P étant pour les deux souris du groupe alimentées sans palmitique, 6,3 et 5,3 et pour les 3 du groupe parallèle, 8,3 6,3 et 5,1.

En conclusion générale nous estimons, que dans des conditions expérimentales réalisées l'adaptation de la répartition des acides gras constitutifs chez la souris doit se faire principalement par la dégradation. Une synthèse différentielle semble incapable de rétablir un équilibre perturbé et nous avons vu bien au contraire que l'acide palmitique est encore abondamment élaboré même si l'organisme en renferme déjà un excès. L'enrichissement d'un organisme en acide palmitique ou en acide stéarique ne paraît pas non plus suivi d'une transformation accélérée des acides gras en acide stéarique par élongation du palmitique ou en acide oléique par désaturation du stéarique. Ces deux transformations sont cependant des réactions importantes du métabolisme des acides gras.

Il est frappant de constater que le métabolisme d'un autre lipide, le cholestérol (31), semble aussi réglé avant tout par la dégradation. D'après nos expériences, on pourrait considérer l'anabolisme des acides gras comme une suite de phénomènes relativement

stables et peu sensibles aux influences extérieures. Seul le comportement des **enzymes** oxydatifs est modifié de façon importante par la composition en acides gras des graisses constitutives.

Une autre conclusion paraît se dégager de nos recherches. Au lieu de synthétiser moins d'acide palmitique, l'organisme enrichi en cet acide en forme davantage. comme dans les mêmes conditions il en accélère la dégradation, c'est donc son renouvellement qui est plus rapide. En contrepartie, la synthèse des acides non saturés, c'est-à-dire surtout de l'oléique se ralentit notablement. Or l'acide palmitique est formé principalement par le système non mitochondrial. Une espèce d'inhibition compétitive semble donc exister entre les deux systèmes, mitochondrial et non mitochondrial, qui tous deux utilisent l'acétyl-CoA.

*
* *

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BERGSTROM S. et PAABO K. - Acta chemica scandin.
8, 1486, 1954.
- 2 - HOWARD G.A. et MARTIN A.J.P. - Biochem. J. 46,
532, 1950.
- 3 - STOFFEL W., CLEN Jr. et AHRENS E.H. - J. Anal.
Chem., 31, 307, 1959.
- 4 - BRADY R.O. et GURIN S. - J. Biol. Chem., 186,
461, 1950.
- 5 - HIRSCH P.F., LOSSOW W.J. et CHAIKOFF I. L. - J.
Biol. Chem., 221, 509, 1956.
- 6 - LANGDON R.G. - J. Biol. Chem. 226, 615, 1957.
- 7 - WAKIL S.J. - Amer. J. Clin. Nutr., 8, 630, 1960.
- 8 - BRADY R.O. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 4, 993,
1958.
- 9 - LYNEN F. - Feder. Proceedings, 20, 941, 1961.
- 10 - BORGSTROM B. - Acta Physiol. Scand., 34, 71,
1955.
- 11 - HORST A., KAGANOWICZ L., ROZYNKOWA D. - Am. J.
Physiol., 201, 617, 1961.
- 12 - STETTEN D.W. et GRAIL G.F. - J. Biol. Chem.,
148, 508, 1948.
- 13 - HEGSTED D.M., WHYMAN C., GOTSIS A. et ANDREWS
S.A. - Amer. J. Clin. Nutr., 8, 209, 1960.

- 14 - TOVE S.B. et SMITH F.H. - J. Nutrition, 71,
264, 1960.
- 15 - CENTURY B., WITTING L.A., HARVEY L.C. et HOR-
WITT M.K. - J. Nutrition, 75, 341, 1961.
- 16 - LOUEDEC A. et PASCAUD M. - C.R. Ac. Sc., 247,
1408, 1958.
- 17 - SCRIBANTE P. et FAVARGER P. - Helvet. Physiol.
Pharmacol. Acta., 12, 4 bis, 89, 1954.
- 18 - SHAPIRO B., CHOWERS I. et ROSE G. - Biochim.
Biophys. Acta., 23, 115, 1962.
- 19 - LYNEN F. - J. Cell. Comp. Physiol., 54, suppl.
1, 33, 1959.
- 20 - MILLER J.P., GOLD P. et SPITLER J.J. - Am. J.
physiol., 202, 370, 1962.
- 21 - Meinertz H. - Fédération proc., 21, n° 2, 284,
1962.
- 22 - SHAPIRO B., CHOWERS I. et ROSE G. - Biochem.
et Biophys. Acta, 23, 115, 1957.
- 23 - SEUBERT W., GREULL G. et LYNEN F. - Angew. Chem.
69, 359, 1957.
- 24 - VOLK M.E., MILLINGTON R.H. et WEINHOUSE S. - J.
Biol. Chem., 195, 493, 1952.
- 25 - LOSSOW W.J. et CHAIKOFF I.L. - Arch. Biochem.
Biophys., 57, 235, 1955.
- 26 - WAKIL S.J. - J. Lipid Research., 2, n° 1, 1,
1961.
- 27 - ANKER H.S. - J. Biol. Chem., 194, 177, 1952.
- 28 - RITTENBERG D. et BLOCH K. - J. Biol. Chem. 160,
417, 1945.

- 29 - ROUS S. - C.R. Ac. Sc. 254, 2446, 1962.
- 30 - SCHONHEIMER R. et RITTENBERG D. - J. Biol. Chem.
113, 505, 1936.
- 31 - CHMOULIOVKY-MOGHISSI M., PRASAD R.C., FAVARGER
P. - Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 20, 73,
1962.

Table des matières

La régulation qualitative des acides gras
chez la souris.

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>TECHNIQUES GENERALES</u>	5
<u>Extraction des acides gras</u>	5
1° Elimination de l'insaponifiable en milieu alcalin	5
2° Extraction proprement dite des acides gras après acidification	6
3° Lavage des acides	7
<u>Hydroxylation</u>	7
<u>Chromatographie sur colonne</u>	
1° Principe	9
2° Technique :	
a) données numériques	10
b) préparation de la poudre	10
c) chromatographie proprement dite..	10
d) récupération des acides élués ...	11
3° Calcul de la répartition des différents acides :	
a) principe	12
b) exemple	12

Chromatographie gaz-liquide :

1° Principe	17
2° Technique :	
a) description de l'appareil..	17
b) renseignements généraux	
- colonne	20
- nature du support	20
- nature et pression du gaz	
vecteur	20
c) chromatographie proprement	
dite	20
3° Mode de calcul	21
4° Comparaison des résultats obtenus	
en chromatographie gaz-liquide et	
en chromatographie sur colonne ..	23

Techniques radio-isotopiques :

1° Principe	24
2° Techniques opératoires :	
a) Préparation des échantillons	26
b) Description de l'appareil..	26
3° Méthodes de calcul :	
a) calcul des activités	
spécifiques	26
b) calcul des activités tota-	
les	27

<u>INFLUENCE DES ACIDES GRAS DU REGIME SUR LA</u>	
<u>SYNTHESE DES DIFFERENTS ACIDES GRAS CHEZ LA</u>	
<u>SOURIS</u>	28

<u>Introduction</u>	28
a) Rappel sur la synthèse des acides gras saturés	29
b) Rappel sur la synthèse des acides gras non saturés	35
<u>Synthèse in vivo</u>	36
<u>Partie expérimentale</u> :	
a) Justification des conditions choi- sies	36
- Temps de comptage	36
- Nature du régime	36
- Durée du régime	37
b) Déroulement des opérations	38
<u>Résultats et discussion</u> :	
a) Influence du régime sur la répartiti- on des différents acides gras dans les réserves	41
b) Influence du régime sur la synthè- se des différents acides gras in vivo	42
c) Etude en fonction du temps	45
d) Influence du régime sur la synthè- se globale	47
<u>Synthèse in vitro</u>	
<u>Partie expérimentale</u>	
a) Justification des conditions choi- sies :	
- choix du régime	45'
- choix de l'inhibiteur	45'

b) Déroulement de l'expérience	
- Régime	46'
- Milieu d'incubation	47'
- Technique d'incubation	47'

Résultats et discussion :

a) Synthèse des acides gras in vitro en l'absence d'inhibiteur	48
b) Synthèse des acides gras in vitro en présence d'inhibiteur	48

MOBILISATION ET DEPART DES ACIDES GRAS DU TISSU ADIPEUX

<u>Introduction</u>	51
---------------------------	----

Partie expérimentale :

a) Justification des conditions de l'ex- périence :	
- principe	52
- albumine du milieu	52
b) Déroulement de l'expérience :	
- milieu et technique d'incubation ...	53
- régime	54

<u>Résultats et discussion</u>	54
--------------------------------------	----

CATABOLISME

<u>Introduction</u>	57
---------------------------	----

Partie expérimentale :

a) Principe et justification des conditions d'expérience	59
---	----

- principe,	
- utilisation de souris à jeun,	
- durée des expériences.	
b) Déroulement de l'expérience	60
- régime,	
- marquage des lipides,	
- mesures respiratoires,	
- mode de calcul.	
<u>Résultats et discussion</u>	63
<u>INTERCONVERSIONS</u>	65
<u>Introduction :</u>	
a) Interconversions entre acides saturés	65
b) Interconversions des acides saturés	
en non saturés	66
c) Interconversions des acides non saturés	
en acides saturés	66
<u>Partie expérimentale:</u>	
a) Justification des conditions de l'expérience	67
- principe,	
- régime,	
- techniques.	
b) Déroulement de l'expérience	68
<u>Résultats et discussion</u>	68
<u>CONCLUSION</u>	71
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	78

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Régulation de la sécrétion des hormones
gonadotropes hypophysaires par les
stéroïdes sexuels, chez les mammifères.

Vu et approuvé:

Montpellier, le

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

B. CHARLES.

Vu et permis d'imprimer:

Montpellier, le

Le Recteur de l'Académie de Montpellier,

